41B 272

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. W. HEUBNER
EM. PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
HEIDELBERG

DR. L. LENDLE
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

CATALOGUED
DEC 22 1955
L. R. V.

224. BAND, 2. HEFT
MIT 30 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 14. DEZEMBER 1954

BOSTON
FEB 2 1955
MEDICAL LIBRARY

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1955

Arch. exper. Path. u. Pharmakol.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie.
Begründet 1873 von *B. Naunyn, O. Schmiedeberg, E. Klebs.* Unter Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben von *L. Krehl, W. Straub, W. Heubner* u. a., ab Band 208/2 unter Mitwirkung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft.

Band 2—158 (1931) Leipzig, F. C. W. Vogel, Band 159—198 (1941) Berlin, F. C. W. Vogel. Ab Band 199 Berlin, Springer.

Die Zeitschrift erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials in Heften, die zu Bänden zusammengestellt werden. Der Preis des Bandes beträgt DM 82.—.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophote u. ä. von den Zeitschriften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Manuskripte sind zu senden an:

Prof. Dr. W. Heubner, Heidelberg, Ladenburger Str. 69,

Prof. Dr. L. Lendle, Göttingen, Geiststr. 9, Pharmakologisches Institut der Universität,

Prof. Dr. L. Heilmeyer, Freiburg i. Br., Hugstetterstr. 55, Medizinische Universitätsklinik,

oder an den

Springer-Verlag

Heidelberg — Neuenheimer Landstr. 24, Fernsprecher 2440

Berlin W 35 — Reichpietschufer 20, Fernsprecher 249251

Vertriebsvertretung im Ausland:
Lange, Maxwell & Springer Ltd., 242 Marylebone Road, London N. W. 1

---

224. Band **Inhaltsverzeichnis.** 2. Heft

Seite

Fóti, M., Z. Mester und **B. Juhász,** Oddi-Sphincter und Choledochusperistaltik. Mit 8 Textabbildungen 95

Meier, R., P. A. Desaulles und **B. Schär,** Verschiedenartiger Wirkungstypus bakterieller „entzündungserregender" Substanzen und anderer „Reizstoffe". Mit 10 Textabbildungen 104

Brücke, F., W. Kobinger und **O. Kraupp,** Über den Antagonismus von Kongorot und anderen Substanzen gegenüber quartären Ammoniumbasen. Mit 6 Textabbildungen 123

Schneider, W., und **H. Rauscher,** Zur in vivo-Inaktivierung von Testosteron bei der Ratte. (Untersuchungen im Fructosetest) 137

Poppe, H., H. Weidemann, K. Hinrichs und **H. Steyer,** Affinität von Thiosemicarbazonderivaten und deren Spaltprodukten zur Nebenniere. Mit 2 Textabbildungen 145

Mechelke, K., und **E. Nusser,** Über die Abhängigkeit der Druck- und Flußänderungen in der Aorta ascendens vom Blutdruck während Arterenolinfusion. Mit 3 Textabbildungen 149

Zetler, G., und **L. Schlosser,** Über die Verteilung von Substanz P und Cholinacetylase im Gehirn 159

Homann, W., Eine papierchromatographische Methode zur Messung der Cholinesteraseaktivität. Mit 1 Textabbildung 176

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Warenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 95—103 (1955).

Aus der röntgenologischen (Leiter: M. Fóti) und der chirurgischen (Leiter: D. Klimkó) Abteilung des Hauptstädtischen Korányi Krankenhauses, Budapest.

Oddi-Sphincter und Choledochusperistaltik.

Von

M. Fóti, Z. Mester, B. Juhász.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. April 1954.)

Die Funktionsstörungen des Choledochus und des Oddi-Sphincters, besonders aber der feinere Mechanismus der Choledochusentleerung, spielen eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese der Krankheiten der Gallenwege.

Schon Westphal beobachtete in seinen Tierversuchen die periodische Entleerung der den Choledochus durchströmenden Flüssigkeit. Die Kontraktionen der oberen Choledochusabschnitte wurden zuerst von Mirizzi durch Cholangiographie nachgewiesen. Nach Mallet-Guy sind die am Choledochus wahrnehmbaren peristaltikähnlichen Einkerbungen kennzeichnend für die Hypertonie. Besonders eingehend befaßte sich mit diesem Problem Hermann, der den Mechanismus der Gallenentleerung durch Röntgenserienaufnahmen verfolgte. Einen besonderen Wert legte er auf die Beziehungen zwischen Duodenumperistaltik und Oddi-Funktion. Auf seine Ergebnisse wollen wir später zurückkommen. Neuerdings wurde in Tierversuchen die eigene Kontraktionsfähigkeit des Choledochus von Fassola nachgewiesen.

Für eine eigene Peristaltik des Choledochus spricht auch, daß Higgins an einer amerikanischen Fischart, der Zwergwels (Ameiurus nebulosus) die entlang der Gallenblase und des Choledochus fortschreitende Peristaltik bis zum Oddi-Sphincter mit dem unbewaffneten Auge verfolgen konnte.

Trotz dieser Daten wissen wir von der Peristaltik der Gallenwege und ihrer Bedeutung recht wenig. Darum versuchten wir die periodische Entleerung der Galle genauer zu studieren und zu registrieren.

Dazu wurde ein Apparat konstruiert (Mester, Juhász, Vörös, 1952), der jeden Tropfen der zwischen den Elektroden der Martin-Kugel durchströmenden Flüssigkeit mit Hilfe einer Elektronenröhrenvorrichtung und des Relais am Kymographion registriert. Dieser Apparat wurde in die von uns (Mester, Juhász, Strehlinger) schon früher beschriebene Druckmessungsvorrichtung eingebaut (Abb. 1).

Im ersten Teil unserer Untersuchungen wurde das Duodenum des narkotisierten Hundes vorgelagert und eröffnet, um die Funktion des Oddi-Sphincters beobachten zu können. Wird der Druckmessungsapparat zunächst auf einen unter dem Durchtrittsdruck liegenden Wert eingestellt und der Druck allmählich gesteigert, so läßt sich der Durchtritt der ersten Tropfen gut wahrnehmen. Wenn nun der Druck auf diesem

Niveau gehalten wird, sieht man, daß der Tropfen immer während der Einatmung erscheint. Dieser mit der Atmung synchrone Sphincterrhythmus läßt sich in der Nähe des Durchtrittsdruckes immer beobachten, was um so mehr auffällt, da unter den gegebenen Versuchsbedingungen die Gallenentleerung ausschließlich von den Änderungen des Sphincter- und Choledochustonus beeinflußt werden dürfte. Ein Einfluß der mit der Atmung zusammenhängenden Druckschwankungen auf die Gallenblase und die intrahepatischen Gallenwege kommt nicht in Frage, da dieser Einfluß durch die Choledochusunterbindung ausgeschaltet wurde. Ebenso wenig können Änderungen des intraabdominellen

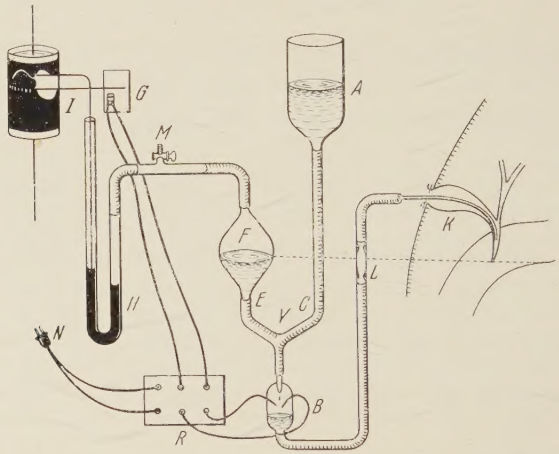


Abb. 1. Anordnung des Meßapparates. *A* Behälter mit lauwarmer physiologischer Kochsalzlösung. *B* Martin-Kugel mit eingebauten Elektroden. *C*, *Y*, *E* Gummischlauchverbindungen. *F* Zur Hälfte mit Kochsalzlösung gefüllter Glasbehälter. Die Flüssigkeitsfläche entspricht dem Ausgangsstand des mit dem Quecksilbermanometer *H*. gemessenen Druckes. Sie soll in das Niveau der Papilla Vateri eingestellt werden. *M* Lüftungshahn, für die Einstellung (während der Messung verschlossen). *I* Kymograph zur Registrierung. *R* Relais. *N* Elektrischer Kontakt. *G* Elektrischer Registrierapparat. *L* Eingeschaltetes Thermometer. *K* Die durch Cholecystostomie bis den Choledochus eingeführte biegsame Kanüle.

Druckes eine Rolle spielen, da die Bauchhöhle nicht geschlossen und das vorgelagerte offene Duodenum sich außerhalb der Bauchhöhle befand. Die mit der Atmung synchrone Tonusänderung wird von dem in der Martin-Kugel sichtbaren Tröpfeln nicht immer registriert, weil der Atemrhythmus ziemlich schnell ist und die hier in Betracht kommenden kleinen Flüssigkeitsmengen von der Trägheit des Apparates ausgeglichen werden.

Unabhängig von dem erwähnten läßt sich am Sphincter ein viel energischerer, wesentlich seltenerer, von der Atmung unabhängiger Rhythmus beobachten. Oft erscheint dieser Rhythmus schon bei einem niedrigen Druck, er ist aber besser zu sehen bei Werten über dem

Durchtrittsdruck. Der Rhythmus äußert sich darin, daß minütlich 4—8mal die Entleerung für eine Zeit unabhängig von der Atmung stillsteht, dann wieder einsetzt (Abb. 2).

Wird die übliche Messung des Residualdruckes vorgenommen, so entleert sich die Flüssigkeit durch die Papilla Vateri in einem dicken Strahl.

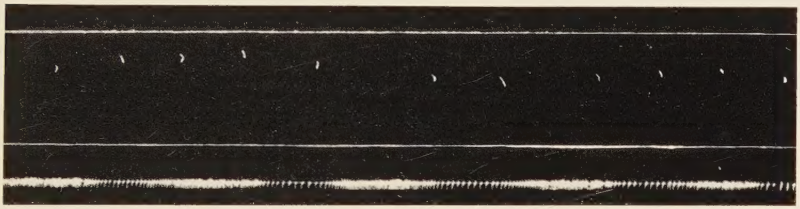


Abb. 2. Registrierung der Tropfenzahl bei gleichbleibendem Druck. Obere Linie: Choledochusdruck. Die kleineren Striche darunter entsprechen der Einatmung. Mittellinie: Ausgangsstand der Druckmessung. Abstand der 2 Linien 27 mm = 54 Hg mm Manometerdruck. An der unteren Linie entspricht jeder senkrechte Strich einem abgefallenen Flüssigkeitstropfen in der MARTINS-Kugel. Die Länge des photographierten Teiles: 38 sec. Die durch Peristaltik verursachte Änderung der Tropfenzahl ist gut bemerkbar.

Bevor aber der Druck den Wert des endgültigen Residualdruckes erreicht, kommt es wiederholt zur Verlangsamung oder Aufhören der Entleerung, um nach einigen Sekunden mit einem immer schwächeren Strahl wieder einzusetzen. Diese Perioden offenbaren sich an der absteigenden Druckkurve als kurze waagerechte Abschnitte, Plateaus. Ihre Zahl zeigt, wie

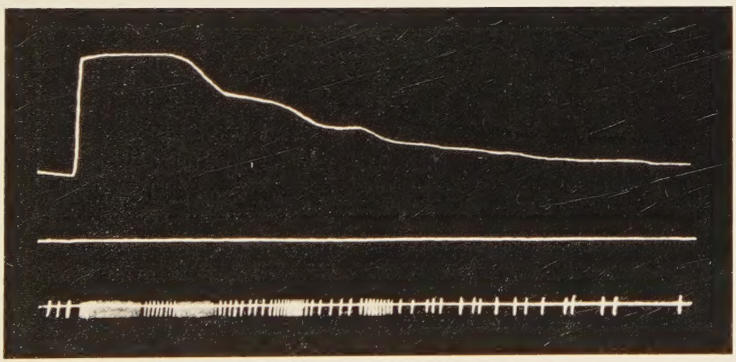


Abb. 3. Registrierung des Residualdruckes. Obere Linie = Druck im Choledochus. Die größte Druckhöhe li.: 27 mm = 54 mm Hg. Residualdruck re.: 11 mm = 22 mm Hg. Mittellinie = Ausgang der Druckmessung. Unten Tropfenregistrierung. Jeder durch die Peristaltik verursachten Verlangsamung der Durchtropfung entspricht eine Niveaubildung an der Druckkurve.

oft eine Kontraktion des Oddi-Sphincters erfolgte, während der Überdruck aufgehört und der Residualdruck sich eingestellt hatte. Die periodische Entleerung läßt sich auch am Manometer verfolgen (Abb. 3).

Die von der Atmung unabhängige rhythmische Tonusänderung ist nicht beständig; sie kann in gewissen Fällen fehlen oder schwach sein,

in anderen Fällen ist sie sehr ausgeprägt. Besonders auffallend ist diese Tonusänderung nach Morphin- oder Eukodaldarreichung, ferner bei wiederholter Verwendung eines größeren Überdrucks oder kalter Flüssigkeit im Verlauf des Versuches. Nach unseren Beobachtungen hängt sie weder mit dem Durchtritts- noch mit dem Residualdruck zusammen. Ähnliche Beobachtungen machte Bottin, nach dem sich die Galle in das Duodenum nicht gleichmäßig, sondern periodisch, in Form von Ejaculationen entleert. Nach den Mahlzeiten sind die Ejaculationen häufig (1—2 pro min), und reichlich (2 cm^3). In der Hungerperiode, wenn die Gallenabsonderung abnimmt, findet 2—3stündlich je eine Ejaculation mit ungefähr 0,7 cm^3 Flüssigkeit statt. Wir glauben, daß die von uns beobachtete Erscheinung — bei künstlich eingestellten Druckverhältnissen — mit den Bottinschen Ejaculationen identisch ist.

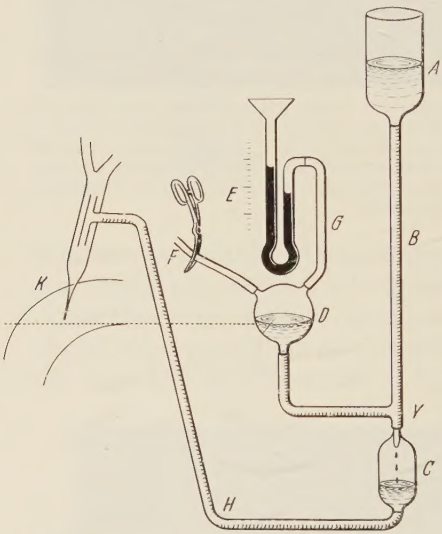


Abb. 4. Vorrichtung für die an Kranken durchgeführten Messungen. *A* Behälter für physiologische Kochsalzlösung. *C* Martin-Kugel. Der Behälter, die Martin-Kugel und die Gummischläuche *B*, *Y* bis *D* und H sind durch Auskochen sterilisiert. *K* Choledochus mit Kehrdrainage. *D*, *E*, *F*, *G*, die von uns bei Operationen angewandte manometrische Vorrichtung. *D* Kugel zur Einstellung des Ausgangspunktes der Manometrie. *F* Lüftungsschlauch. *E* Quecksilbermanometer.

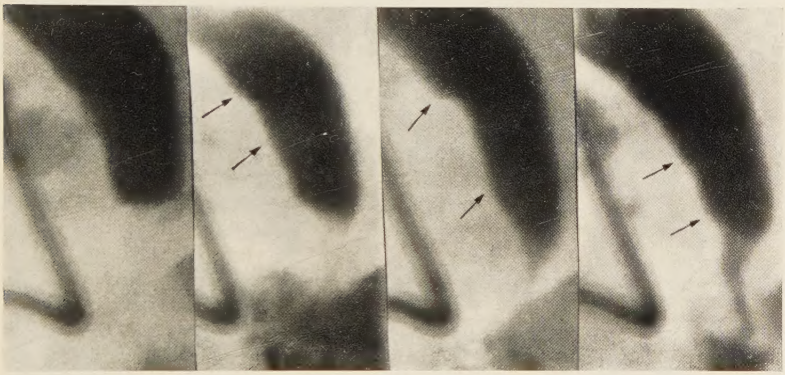
Die periodische Entleerung der Galle wurde übrigens auch von Brüno, Klodnizky und Boldyreff studiert. Die von der Atmung abhängige Periodizität wurde am Menschen auch von Hermann beobachtet und registriert, aber unter anderen Bedingungen als den unsrigen.

Zur Beobachtung der rhythmischen Tätigkeit des Oddi-Sphincters beim Menschen haben wir einen auskochbaren Apparat zusammengestellt. Die körperwarme physiologische Kochsalzlösung wird aus einem Behälter in den Gallenleiter eingeführt und die Tropfzahländerungen werden von der in das Rohrsystem eingeschalteten Martin-Kugel abgelesen (Abb. 4). Wir fanden wie beim Versuchstier eine rhythmische Tonusänderung.

Die Duodenalperistaltik scheint von diesen Tonusänderungen des Oddi-Sphincters vollkommen unabhängig zu sein. Am offenen Darm war es klar zu sehen, daß seine Peristaltik auf die Intensität der durch den Sphincter strömenden Flüssigkeit keinen Einfluß ausübte. Das Aufhören der Strömung fand auch dann statt, wenn die Darmwand sich in voller Ruhe befand. Die Ergebnisse von Hermann weichen von der unsrigen ab,

jedoch arbeitete er bei einer künstlich gesteigerten Duodenumperistaltik; er beobachtete das Aufhören der Gallenentleerung, wenn die spastische Peristaltik den zweiten Abschnitt des Duodenums erreichte. Bei unseren Versuchen war die Darmperistaltik immer natürlich und mild.

Um zu beweisen, daß die rhythmischen Tonusänderungen durch die eigene Peristaltik des Choledochus bedingt sind, war eine genaue Analyse der Choledochusperistaltik notwendig. Zu diesem Zweck wurde bei einigen Kranken, deren Gallenleiter nach KEHR drainiert war, das Röhrenende mit einem sterilen Trichter verbunden und durch den Trichter eine 70%ige JODURON(Cilag) eingeführt. Bei jeder Untersuchung wurden



a *b* *c* *d*

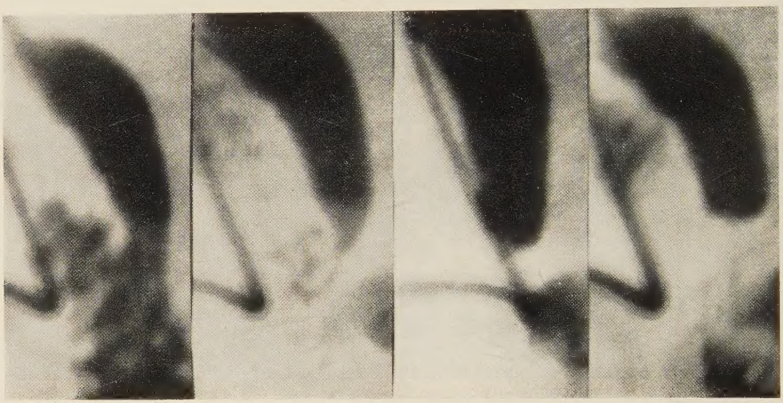
Abb. 5. I. Serienaufnahme unter Kontrastmittelperfusion bei konstantem Druck. Erweiterter Choledochus. *a* (li.) = ruhender Choledochus mit glatten Konturen und halbkreisartig geschlossenem Ende. *b* Kleine Einkerbung am oberen Choledochusabschnitt. Zwischen den Pfeilen beginnende Zuspitzung des unteren Endes. *c* Die Einkerbung ist größer und tiefer, die Zuspitzung des unteren Schattenendes ist ausgeprägter. *d* Beginnende Entleerung. Der obere Abschnitt weniger zusammengezogen, die Verschmälerung des Schattens ist unmittelbar über dem Sphincter zu beobachten.

60—100 cm^3 verbraucht. Während der Kranke auf dem Trochoskop lag, beobachteten wir auf dem Röntgenschirm unter allmählichem Heben des Trichters jenen Augenblick, in dem der Kontraststoff infolge des zunehmenden Druckes in den Darm einzufließen begann. Als die rhythmische Entleerung des Kontraststoffes in das Darmlumen am besten gesehen wurde, haben wir in 1—3 sec Abständen Serienaufnahmen angefertigt. Von den Aufnahmeserien werden hier zwei abgebildet.

Die erste Serie weist einen erweiterten Choledochus auf (Abb. 5). Das erste Bild zeigt den ruhenden Choledochus, mit glatten Konturen und einem halbkreisartig geschlossenen Ende. Die nächste Aufnahme zeigt am oberen Choledochusabschnitt eine kleine Einkerbung und eine sanft beginnende Spitze des unteren Endes (siehe Pfeile). Auf der dritten Aufnahme erstreckt sich die Einkerbung schon auf einen tieferen Abschnitt und auch die Zuspitzung des unteren Schattenendes ist länger. Am

nächsten Bild sieht man die beginnende Entleerung. Der obere Abschnitt scheint weniger kontrahiert, als an der vorigen Aufnahme, die Verjüngung des Schattens ist direkt über dem Sphincter zu beobachten. Die folgenden Aufnahmen zeigen die allmähliche Rückkehr des Choledochus zum Ruhezustand (Abb. 6).

Die zweite Serie stellt einen normalweiten Choledochus dar. Die Einkerbung erscheint an einem höheren Abschnitt, um langsam nach unten fortzuschreiten (Abb. 7). Inzwischen öffnet sich allmählich der Oddi-Sphincter und der Kontraststoff fließt in den Darm hinein. An der 3. Aufnahme sieht man neben der Choledochusspitze einen schmalen



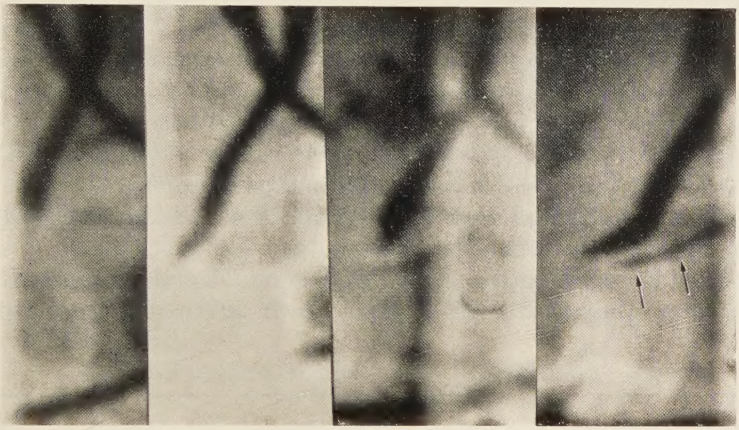
a *b* *c* *d*

Abb. 6. Fortsetzung der vorangehenden Abbildung. *a* Reichliche Entleerung; viel Kontrastmittel im Duodenum. *b* Beendigung der Entleerung, der untere Teil des Choledochus ist noch zusammengezogen. *c* Beginnende Erschlaffung des Choledochus. *d* Ruhender Choledochus.

Fleck, der an der nächsten Aufnahme stärker hervortritt: der Wirsungsche Kanal (Pfeile). Die 5. Aufnahme (Abb. 8) zeigt die Entleerung in vollem Gange; der Wirsungsche Kanal ist stark ausgefüllt, sein distaler Abschnitt ist aber im Vergleich mit dem vorigen verschmälert, nur sein sphincternaher Abschnitt ist weiter. Man gewinnt beinahe den Eindruck, daß auch dieser Kanal eine Peristaltik besitzt. Diese Beobachtungen lassen die Folgerung zu, daß die am Choledochus wahrnehmbaren Einkerbungen peristaltischen Kontraktionen entsprechen, die entlang des Gallenleiters ziehen. Das Übertreten der Galle in das Duodenum bzw. die Öffnung des Oddi-Sphincters erfolgt zu der Zeit, wo die Kontraktionswelle an den Sphinctermuskel herankommt.

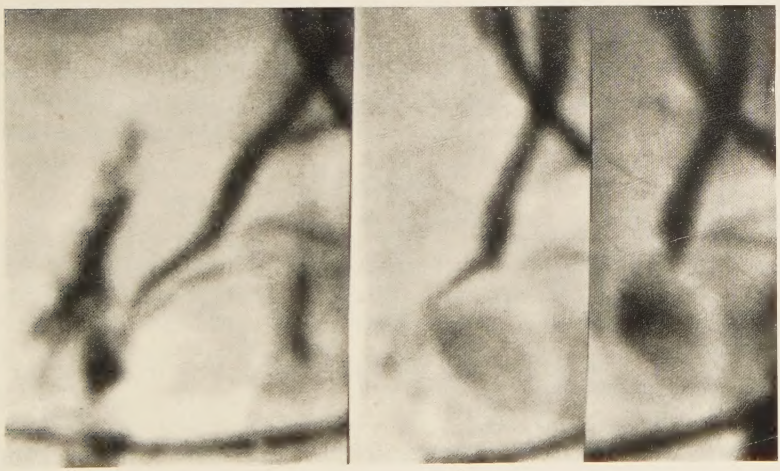
Es ist interessant zu beobachten, daß die Sphincteröffnung allmählich, von oben nach unten fortschreitend stattfindet. Zunächst wird der Choledochusschatten verlängert, dann erweitert sich der obere Sphincterabschnitt, schließlich öffnet sich der duodenumnahe Teil. Dieser Mechanismus liegt in einem Teil der Fälle der Füllung des Wirsungschen

Kanals zugrunde, falls seine Öffnung, innerhalb des vordersten Sphincterabschnittes liegt. In diesen Fällen kommt es bei der Erschlaffung des



a *b* *c* *d*

Abb. 7. II. Serienaufnahme. Normal weiter Choledochus. *a* Ruhender Choledochus. *b* Beginnende Kontraktion, Zuspitzung des unteren Endes. *c* Ausgesprochene Verengung des oberen Abschnittes, beginnende Füllung des WIRSUNG-Kanals, neben der Spitze des Choledochusschattens. *d* Gut gefüllter WIRSUNG-Kanal (Pfeil), Choledochus zugespitzt.



a *b* *c*

Abb. 8. Fortsetzung der vorangehenden Abbildung. *a* Reichliche Entleerung, Unterteil des Choledochus und der WIRSUNG-Leitung ist gut dargestellt, der Oberteil ist entleert und zusammengezogen. *b* Entleerte WIRSUNG-Leitung, beginnende Choledochuserschlaffung. *c* Ruhender Choledochus.

oberen Sphincterabschnittes zur allmählichen Füllung des Kanals, der sich entleert, wenn der Vorderteil des Sphincters erschlafft ist. Es ist wahrscheinlich der Krampf dieses vorderen Abschnittes, der zur Mischung

von Galle und Pankreassaft, ferner zum Rückfluß dieser Mischung in den Gallenleiter oder den Wirsung-Kanal Anlaß gibt. Dieser Mechanismus kann verschiedene krankhafte Zustände zur Folge haben.

Offenbar entspricht jeder einzelnen peristaltischen Welle des Choledochus eine Sphincteröffnung, die vom Schreibapparat des Tropfenzählers als eine rhythmische Änderung der Tropfzahl registriert wird. Die Annahme ist sonach berechtigt, daß die rhythmische Tonusänderung des Sphincters lediglich eine Ausdrucksform der Choledochusperistaltik darstellt. In dieser Weise läßt sich die Choledochusperistaltik durch eine einfache Methode experimentell, während oder nach einer Operation, durch Choledochusdrainage beobachten.

Unsere Untersuchungen an Menschen mit der Tropfzählungsmethode der Gallenwegeperistaltik haben wir in der Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 1. *Untersuchung der Gallenleiterperistaltik beim Menschen.*

Nr.	Klin. Diagnose	Am . . . Tage nach Op.	Durchtritts-Residual-Druck Hg mm		Mit d. Atm. synchroner Rhythmus	Peristaltik
1.	Steinblase. Explor. choledochotomie	2.	11	12	sehr mild	2 min sehr mild
2.	Icterus Chron. Hepatitis, ohne Steine	5.	12	11,5	0	0
3.	Choledocholithiase	7.	14	14,5	0	sehr stark 12 min
4.	Oddi-Hypertonie, Reop. Erweiterung, Durchschneiden e. Plex. hep. post.	8.	—	14—23	0	reizbar, 8 min
		26.	21	23,5	mild	0
5.	Choledocholithiasés	5.	11	10,5	ausgeprägt	kaum merkb. 5 min
6.	Reop., Reststein im Cysticus	8.	—	—	mild	20 min
7.	Choledocholithiasés	13.	8	9	0	stark, 4 min

Nach unserer Ansicht wäre es verfrüht, aus diesen Untersuchungen klinische oder pathologische Schlüsse zu ziehen, Soviel scheint aber festzustehen, daß die Intensität der Peristaltik bei einzelnen Kranken sehr verschieden sein kann. Die Peristaltik war in einigen Fällen sehr stark, in anderen schwach oder sie fehlte vollkommen, wie z. B. in einem Fall von chronischer Hepatitis (Nr. 2 der Tabelle). Die mit der Atmung synchronen Tonusänderungen kommen beim Menschen ziemlich oft vor (Nr. 1, 4, 5, 6 der Tabelle).

Die Peristaltik spielt in der Gallenentleerung eine bedeutsame Rolle. Wahrscheinlich sorgt die Peristaltik auch dafür, daß Galle und Bauchspeichel sich im allgemeinen nicht mischen. Unter pathologischen Umständen wird auch der Abgang von Fremdkörpern aus den Gallenwegen gefördert. Hermann beobachtete in einem Fall, daß die in die Gallenwege gelangten Ascariden eine heftige Peristaltik auslösten und in einigen Tagen von dort verschwanden. Wir fanden in zwei sezierten Fällen, daß im Gefolge der aktiven Sphincter- und Choledochusperistaltik ein Stein aus den Gallenwegen abgegangen und in der Schleimhauttasche der Papilla Vateri stecken geblieben war. Dort gab es keine Peristaltik, der Stein konnte nicht weiter gelangen, obwohl der Widerstand, der gegen das Duodenum hin zu überwinden war, wesentlich geringer war, als jener, der ihm während seines Fortschreitens durch den engen muskulösen Sphincterring begegnete.

Zusammenfassung.

Die rhythmischen Änderungen der Strömung der Perfusionsflüssigkeit durch die Gallenwege werden besprochen. Diese Änderungen wurden mit Hilfe einer entsprechenden Vorrichtung genau beobachtet und registriert. Durch die Herstellung von Röntgenserienaufnahmen wurde nachgewiesen, daß die Öffnung des Oddi-Sphincters und der Gallenaustritt immer zu dem Zeitpunkt stattfindet, wenn die peristaltische Welle am Choledochus abwärts verlaufend zum Sphincter gelangt. Diese Erscheinung wurde sowohl bei Versuchshunden wie auch beim Menschen beobachtet; sie wird für die Zukunft als eine einfache Untersuchungsmethode der Choledochusperistaltik empfohlen.

Literatur.

Bottin, J. M.: Congrès Intern. de l'insuffisance hépatique. (1937) Vichy. Comptes rendues. II. Paris: Wallon 1937. — Brüno: Diss. St. Petersburg (1898). — Boldyreff, W. N.: Die periodische Arbeit des Verdauungsapparats bei leerem Magen. Diss. St. Petersburg (1904). — Babkin, B. P.: Die äußere Sekretion der Verdauungsdrüsen. Berlin: Springer 1914. — Fassola, A.: Act. argent. Fisiol. y Fisiopat. **3**, 31—38 (1953). — Hermann, K. O.: Fortschr. Röntgenstr. **75**, 66—72 (1951); **75**, 684—694 (1951); **76**, 215—217 (1952). — Z. inn. Med. **7**, 264—266 (1952). — Higgins, G. M.: Arch. Surg. **16**, 1021—1038 (1928). — Klodnizki: Über den Gallenaustritt in den Zwölffingerdarm. Diss. St. Petersburg. (1902). — Mester, Z., B. Juhász u. L. Strehlinger: J. interpat. Chir. 1952. — Mallet-Guy, P. R., Jeanjean et P. Marion: La chirurgie biliaire sous controle manometrique et radiologique peroperatoire. Paris: Masson et Cie. 1949. — Mirizzi, P. L.: Mém. Acad. Chir. 732 (1951). — Prensa méd argent. **1951**, 1545—1549 Ref.; Excerpta **9**, 3837 (1952). — Westphal, K.: Z. klin. Med. **96**, 22—51 (1923); **115**, 99—209 (1931).

Dr. M. Fóti, Budapest/Ungarn, Pozsonyistr. 46.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 104—122 (1955).

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der Ciba Aktiengesellschaft Basel.

Verschiedenartiger Wirkungstypus bakterieller „entzündungserregender" Substanzen und anderer „Reizstoffe".

Von

R. Meier, P. A. Desaulles und B. Schär.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. Juli 1954.)

Es hat nicht an eingehenden Untersuchungen gefehlt, um die „kausalen" Zusammenhänge zwischen der Einwirkung eines entzündungserregenden Agens und dem anschließenden Entzündungsvorgang zu analysieren. Schon aus früheren pathologisch-anatomischen Untersuchungen besonders von Leber, Cohnheim, Rössle, Ricker und Marchand[10] geht hervor, daß entzündungserregende Einwirkungen verschiedenartige Formen des Entzündungsprozesses auslösen können. Aber erst die Arbeiten von Heubner[4, 5] haben gezeigt, daß eine weitgehende Differenzierung des Wirkungsmechanismus „entzündungserregender" Stoffe durch geeignete Untersuchungen mit tierexperimentellen Methoden erreicht werden kann. Seine Befunde zeigen in überzeugendster und klarer Weise, daß sogenannte Reizstoffe in scharf trennbare Kategorien eingeordnet werden können, wie Nervengifte, Kapillargifte, gewebsschädigende Stoffe und so fort. Es geht aus diesen Befunden somit hervor, daß sowohl der primäre Angriffspunkt und der primäre Wirkungstypus verschieden sein kann, als auch verschiedene und weitgehend gleichartige Endzustände des Entzündungsvorganges durch primär verschiedene Angriffsmechanismen hervorgebracht werden können. Diese Betrachtung führte zu dem Schluß, daß eine weitere Analyse des Ablaufes der entzündlichen Reaktion notwendig ist, wenn alle auftretenden Phänomene als direkte Folge der primär angewandten Substanz oder sekundär von dieser abhängige Veränderungen interpretiert werden sollen[6].

Den Versuch einer solchen weitergehenden Analyse haben besonders Untersuchungen von Menkin, Delaunay und anderen mit Hilfe von pathologisch-anatomischen tierexperimentellen Methoden durchgeführt. Sie bedienen sich der Untersuchung der Wirkung entzündungserregender Einwirkungen nach Applikation am tierischen Organismus. Besonders Menkin[18] hat zusätzlich das Verfahren angewandt, die durch die Entzündung entstandenen Produkte wie Exsudate oder entzündete Gewebe

zu extrahieren und in diesen Stoffe, bzw. deren Wirkung nachzuweisen, die für den Entzündungsvorgang von Bedeutung sind. Die Analyse dieser Wirkung wird so durchgeführt, daß die Stoffe am Tier appliziert werden und das Resultat der Wirkung durch „histologische" Untersuchungen der Gewebe festgestellt wird. Menkin hat auf Grund seiner Untersuchungen eine Reihe von Entzündungsstufen in interessanter Weise charakterisiert und Argumente dafür erbracht, daß verschiedene Stoffe in entzündlichen Exsudaten vorhanden sind, welche verschiedene Wirkungen haben, die Kapillarpermeabilität beeinflussen, die Leukocytenanwanderung bedingen, Nekrose hervorrufen und so fort. Es ist ohne weiteres zuzugeben, daß gewisse Phänomene einer Wirkung und damit eine bestimmte Differenziertheit entzündungserregender Effekte zunächst nur am Tier festgestellt werden können.

Trotzdem muß wohl zur endgültigen Charakterisierung dieser Effekte verlangt werden, daß die festgestellten Wirkungen in gleicher Weise an dem einfachen Objekt, an dem sie sich im Tier auswirken, wie der „isolierten" Kapillare, der „isolierten" Warmblüterzelle usw. vorhanden sein müssen, wenn bewiesen werden soll, daß diese Primärwirkung der Stoffe die alleinige und ausschließlich in Frage kommende Ursache eines bestimmten Vorganges ist. Es konnte von dem einen von uns[11] nicht bestätigt werden, daß der die Kapillarpermeabilität steigernde Stoff von Menkin ein „Leukotaxin" ist, wie dieser vermutete. Die chemotaktische Wirkung an Leukocyten in vitro ist unabhängig von der permeabilitätssteigernden Wirkung.

Der eine von uns hat früher weiterhin eindeutig gezeigt[12], daß viele Stoffe, welche im tierischen Organismus von den verschiedensten Autoren beschriebene chemotaktische Wirkungen ausüben, in vitro nicht im geringsten diese Wirkungen besitzen. Weiterhin zeigen viele sogenannte Reizstoffe bzw. entzündungserregende Stoffe in vitro nur schädigende Wirkungen an isolierten Zellen. Der Nachweis einer rein schädigenden Wirkung in vitro ergibt naturgemäß nur eine Erklärung für die bei der entzündlichen Reaktion im Tier auftretenden „schädigenden" Effekte. Es ist deshalb besonders für die reparatorisch-reaktiven Vorgänge, die wohl vor allem Interesse besitzen, anzunehmen, daß solche im tierischen Organismus beobachtete Effekte nicht auf die „direkte" Wirkung der angewandten Substanz bezogen werden können.

Es wurde nun weiterhin gezeigt, daß zwischen gewissen Wirkungen in vitro und im tierischen Organismus für derartige „positive" Wirkungen eine Parallelität besteht, so z. B. für Bakterien, Wirkungen welche besonders von R. Meier geprüft wurden[11, 12, 13]. Er konnte zeigen, daß unter gewissen Bedingungen Bakterien sowohl chemotaktische Wirkung als auch besonders in Kombination mit Leukocyten Fibroblastenwachstum anregende Wirkung ausüben können, also Vorgänge auslösen, welche

direkt im Organismus beim Entzündungsvorgang in gleicher Weise gefunden werden. Es war aber die weitere Analyse dieser Beobachtungen erheblich erschwert, als es nicht ohne weiteres gelang, aus den Bakterien und ihren Produkten Stoffe zu isolieren, welche diese Wirkungen besitzen. Dieses lag zum Teil daran, daß in den früheren Untersuchungen von R. Meier[11] vor allen Dingen Kokken für diese Versuche herangezogen wurden. In späteren Untersuchungen von uns konnte festgestellt werden, daß Kokken unter den Bedingungen der Bouillonkultur keine chemotaktischen Stoffe bilden[14]. Es war deshalb, wie es auch R. Meier[12] angewandt hat, notwendig, komplizierte native Nährböden, z. B. Plasmanährböden, zu benutzen, mit deren Hilfe es R. Meier[15] gelang, chemotaktische Stoffe aus Streptokokken- und Staphylokokkenkulturen zu gewinnen. Aus gramnegativen Bakterien gelingt es dagegen auch in Bouillonkultur relativ leicht chemotaktisch hochwirksame Fraktionen zu erhalten, die wir kürzlich beschrieben haben [14]. Andere Untersuchungen hinsichtlich des Nachweises eines direkten Zusammenhangs zwischen der Wirkung in vitro und der Wirkung im tierischen Organismus für chemische Substanzen wurden nur in sehr beschränktem Maße durchgeführt. Von mehreren Forschern[1, 2, 8, 9, 21] wurde gezeigt, daß Glykogen und Stärke, d. h. polymere Kohlehydrate, und auch gewisse Gewebsextrakte in vitro chemotaktische Wirkung besitzen und daß die gleichen Produkte unter gewissen Umständen im tierischen Organismus zu Absceßbildung führen können. Es ist aber kaum anzunehmen, daß derartige Substanzen wie einfache polymere Kohlehydrate beim Entzündungsvorgang im tierischen Organismus in einer derartigen Konzentration entstehen, daß sie für diese Reaktionen irgendwie in Betracht kommen können. Es ist deshalb anzunehmen, daß von Bakterien oder auch im Gewebe gebildete andere Stoffe maßgebend für spezifische Reaktionen der Zellen beim Entzündungsvorgang sind. Hinsichtlich der zellwachstumsanregenden Wirkung von Extrakten aus Entzündungsprodukten auf Bindegewebselemente liegen keine eindeutigen Befunde vor. Bei dieser Sachlage schien es uns von Interesse, die Wirkung der chemotaktisch stark wirksamen Bakterienprodukte in einer Reihe von Versuchsanordnungen zu prüfen, um die Parallelität der Effekte in vitro und ihrer Wirkung im tierischen Organismus eingehender zu charakterisieren. Interessant erschien es weiter, für diese Untersuchungen Produkte aus Bakterien heranzuziehen, für die gewisse Wirkungen im tierischen Organismus bereits beschrieben worden sind, z. B. das Piromen, von dem angenommen wird, daß es auf die Regeneration von Verletzungen am Nervensystem fördernd einwirkt[22] und das Shearsche Polysaccharid, von dem besonders Wirkungen an Tumoren bekannt sind[20].

Das Objekt unserer Untersuchungen ist somit folgendes: nachzuweisen, ob hochgereinigte Bakterienprodukte, die in vitro einen spezi-

fischen Wirkungscharakter besitzen, im tierischen Organismus eine Wirkung zeigen, die Analogien zur Wirkung in vitro besitzt. Ergänzend zu diesen Untersuchungen schien es richtig, gleiche Versuche nochmals mit chemisch definierten entzündungserregenden Stoffen durchzuführen, um festzustellen, ob ihre Wirkung in bestimmten Testen verschieden von den typischen Wirkungen der Bakterienprodukte sind, auch wenn sie in gewissem Umfange im tierischen Organismus eine ähnliche Wirkung hervorrufen.

Es war zur Erzielung derartiger Befunde notwendig verschiedene Methoden zu verwenden, die eine Charakterisierung der Wirkung in vitro und in vivo in einigermaßen differenzierter Form erlauben. Die Methoden in vitro waren durch die früheren Untersuchungen gegeben; für die Charakterisierung der Wirkung in vivo haben wir zusätzlich zur Bestimmung der Reizwirkung die von uns früher ausgearbeitete und beschriebene Methode des Bindegewebsgranolums herangezogen, die uns besonders geeignet für diesen Zweck erschien. Alle diese Wirkungen zusammen dürften ein Urteil über die direkte und „indirekte" Wirksamkeit dieser Substanzen hinsichtlich der entzündungserregenden Wirkung ermöglichen.

Die Untersuchungen umfassen somit folgende drei Gruppen:

1. Untersuchungen der Wirkung auf Hühnerleukocyten- und Fibroblastenwachstum in vitro.

2. Untersuchung der Reizwirkung am Kaninchenauge.

3. Untersuchungen auf die Entwicklung des Bindegewebsgranuloms einschließlich histologische Untersuchung.

Methoden.

1. Leukocytenauswanderung. Nach Abhebern des Plasmas vom zentrifugierten Vollblut wird durch Auftropfen von geringen Mengen Embryonalextrakt die Leukocytenhaut zum Gerinnen gebracht. Durch Waschen in Tyrode wird das Gerinnsel von anhaftenden Erythrocyten befreit. Mit dem Starmesser werden Würfel von etwa 2 mm Kantenlänge geschnitten. Diese werden zu je 5 Stück in einen Nährboden von 1,25 cm^3 Hühnerembryonenextrakt und 1,25 cm^3 Hühnerplasma eingebettet. Zur Erzielung guter Resultate ist es wichtig, daß die Kulturschalen einen genauen Durchmesser und einen absolut planen Boden besitzen, da die Auswanderungsgröße abhängig ist von der Dicke des Nährbodens. Das Auswanderungsareal wird in mehreren Zeitintervallen planimetriert. Die Planimeterwerte können bei Verwendung von Leukocyten eines Tieres und eines für alle Kulturschalen gleichen Plasma- und Embryonalextraktgemisches innerhalb eines Versuches direkt miteinander verglichen werden.

2. Mitosenuntersuchungen an Fibroblasten. Hühnerfibroblasten der 5. Passage werden 24 Std nach der letzten Teilung als Deckglaskulturen

während 8 Std mit der zu untersuchenden Substanz in Tyrode gelöst im Hohlschliffobjektträger in Kontakt gebracht. Nach Ablauf dieser Zeit wird mit Carnoy fixiert und mit Hämatoxylin nach P. Mayer gefärbt. Mit Hilfe dieser Methode können Schädigungen an Interphasenzellen und Mitosen dargestellt werden.

3. *Prüfung auf Reizwirkung.* Die Reizwirkung wurde am Kaninchenauge in üblicher Weise untersucht. Die Präparate wurden in eine 50% Mischung hochgereinigten Propylenglykols in physiologischer Kochsalzlösung in zunehmender Verdünnung gelöst. Die stärkste untersuchte Konzentration betrug jeweils 10^{-2}, sofern sie durchführbar war. Es wurden 2 Tropfen dieser Lösung in das rechte Auge eines Kaninchens eingeträufelt, 2 Tropfen Lösungsmittel als Kontrolle in das linke Auge. Beobachtet wurden die Gefäßinjektion der Konjunktiva, die Chemosis, ob ödematös oder eitrig und die Nekrose des Epithels nach 24 Std. Nach Einträufelung wurden die Augen in Abständen von 5, 10, 15, 30, 45 min, 1, $1^1/_2$, 4, 6 und 24 Std beobachtet. Alle Versuche wurden dreimal an verschiedenen Kaninchen wiederholt.

4. *Granulombildung.* Wie wir es schon in anderen Arbeiten beschrieben haben[16], wurde die subcutane Granulomerzeugung an normalen männlichen Ratten im Gewicht von 100—110 g untersucht. Da es sich in dieser Arbeit prinzipiell um granulomfördernde Substanzen handelt, haben wir zur besseren Definition dieser Wirkung auf Implantate, die schon von selber eine ausgeprägte Granulomgewebebildung erzeugen, verzichtet, wie es z. B. mit Rohwatte-Preßlingen der Fall ist. Wir haben nach zahlreichen Vorversuchen die Verwendung von Agarwürfeln vorgezogen und systematisch durchgeführt. Verwendet wurde gereinigter Agar (Diatomeenfrei) in 5% Konzentration in physiologischer Kochsalzlösung. Dieser Agar wurde mit Soerensen Phosphatpuffer auf p_H 7,4 gebracht. Folgende Tabelle (Tab. 1) zeigt die Fremdkörpergranulom erzeugende Wirkung verschiedener Agarpräparationen verglichen mit Rohwatte.

Tabelle 1.

Verschiedene Implantate	Fremdkörpergranulomgewicht	
	frisch mg	trocken mg
I. Rohwatte Preßling zu 50 mg	350	50
II. 5% gewöhnl. Agar in dest. Wasser zu 100 mg/Implant.	138	23
III. 5% gereinigter Agar in dest. Wasser zu 100 mg/Implant.	71	16
IV. 5% gereinigter Agar in 0,85% NaCl-Lösung zu 100 mg/Implant.	89	18
V. 5% gereinigter Agar in 0,85% NaCl-Lösung gepuff. auf 7,4 zu 100 mg/Implant.	30	2,5

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die von uns verwendeten Agarwürfel eine sehr schwache Eigenwirkung besitzen. Diese Wirkung war trotzdem genügend stark ausgeprägt, um eine vorliegende hemmende Wirkung des Präparates mit Sicherheit feststellen zu können. Die Agarwürfel wurden so hergestellt, daß es möglich war, auf ein Würfelgewicht von 100 mg eine genaue Konzentration des zu untersuchenden Präparates in jedem Würfel zu sichern. Den Tieren wurden beidseitig dorsal Würfel subcutan implantiert. Auf die rechte Seite wurden die mit Präparat beschickten Agarwürfel, auf die linke Seite gewöhnliche Agarwürfel als Kontrolle implantiert. 7 Tage nach Implantation wurden die entstandenen Granulome herauspräpariert und in frischem und getrocknetem Zustand gewogen.

5. *Untersuchte Substanzen.* Die untersuchten Bakterienprodukte waren Fraktionen von Kulturfiltraten, die von Dr. F.W. Kahnt in unserem chemischen Laboratorium hergestellt wurden. Die hohe Wirksamkeit auf Leukocyten einzelner dieser Fraktionen wurde bereits von uns beschrieben. Zur Differenzierung des Wirkungscharakters wurden zum Vergleich Bakterienfraktionen, die diese in vitro-Wirkung nicht zeigten, herangezogen, u. a. Lipopolysaccharide und Phosphatide aus Mycobakterien, die wir Dr. E. Lederer verdanken. Von in der Literatur beschriebenen definierten Bakterienprodukten wurden Piromen aus Pseudomonas (Travenol Labs.) und das Shearsche Polysaccharid untersucht. Aus der Gruppe der entzündungserregenden chemisch definierten Stoffe wurden Veratrin (Siegfried), Stickstoffsenfgas (Dichloren CIBA), Monojodessigsäure, Crotonöl (Ph. H. V) und Ricin verwandt, somit eine kleine Auswahl von Stoffen, die verschiedenen Wirkungstypen zugehören.

Versuchsergebnisse.

A. Die Wirkung auf Leukocyten und Fibroblasten.

Wie bereits beschrieben, zeigen nur bestimmte Fraktionen der Aufarbeitung von Kulturfiltraten von Proteus eine hohe spezifische emigrationsfördernde Wirkung an Leukocyten. Die hier verwendete Fraktion, der alle Charakteristika eines Polysaccharids eigen sind, zeigt diese Wirkung bis zu Konzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-8}. Wir haben an anderer Stelle beschrieben, daß auch aus anderen Bakterienarten ebenfalls hochwirksame analoge Fraktionen gewonnen werden können. Von diesen Fraktionen stand uns durch die Freundlichkeit von Dr. Shear das von ihm aus Serratia marcescens gewonnene Polysaccharid in genügender Menge zur Verfügung. Auch dies zeigt eine hohe leukocytenfördernde Wirksamkeit, analog wie das aus Proteus gewonnene Produkt. Piromen zeigt ebenfalls eine relativ hohe Wirkung an Leukocyten. Diese ist über einen großen Konzentrationsbereich von hemmender Art und wird erst

in hohen Verdünnungen leicht fördernd. Da uns Ampullenware zur Verfügung stand, läßt sich nicht sicher entscheiden, ob Piromen tatsächlich einen etwas andersartigen Stofftypus darstellt. Neben diesen Bakterienpolysacchariden zeigen andersartige Fraktionen aus Proteus (Präp. 14644/1) und auch aus Mycobakterien (Lipopolysaccharide, Phosphatide), nur geringe oder keine fördernde Wirkung an Leukocyten.

Tabelle 2.

Substanzen	Reizwirkung (Kaninchenauge)			Granulombildung	Gewebekulturen	
	Hyperaemie	Chemosis	Epithelnekrose	Lokal (Ratte)	Leukozytenauswanderung	Wirkungs-Typus an Fibroblasten Kulturen
Veratrin (Siegfried)	10^{-4}	$\varnothing_{10^{-2}}$	$\varnothing_{10^{-2}}$	10^{-6}	$>10^{-4}$	MITOCHONDRIEN 10^{-5}
Stickstoffsenfgas (Dichloren „Ciba“)	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-7} / 10^{-5}	10^{-5}	POLYVALENTE 10^{-4}
Monojodessigsäure	$>10^{-5}$	10^{-4}	10^{-3}	10^{-7}	10^{-6}	PROTOPLASMA 10^{-5}
Ricin	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-9}	$>10^{-5}$	KERN $>10^{-5}$
Crotonöl (Ph. H. V.)	$>10^{-5}$	10^{-5}	10^{-3}	10^{-7}	10^{-6}	$\varnothing_{10^{-4}}$
Lipopolysaccharid TBC „Brévannes“	10^{-3}	10^{-3}	$\varnothing_{10^{-2}}$	10^{-6}	10^{-3}	10^{-4}
Phosphatid BCG	10^{-3}	10^{-2}	$\varnothing_{10^{-2}}$	10^{-7}	10^{-4} / 10^{-3}	10^{-4}
Phosphatid Myc. phlei	10^{-2}	10^{-2}	$\varnothing_{10^{-2}}$	10^{-7}	10^{-4}	$\varnothing_{10^{-4}}$
Proteus Kultur Fraktion 14644/1	10^{-2}	10^{-2}	$\varnothing_{10^{-2}}$	10^{-8}	$\varnothing_{10^{-4}}$	$\varnothing_{10^{-4}}$
Shear'sPolysaccharid (Serr. marcescens)	10^{-2}	$\varnothing_{10^{-2}}$	$\varnothing_{10^{-2}}$	10^{-8}	10^{-7}	$\varnothing_{10^{-4}}$
Piromen (Pseudomonas)	$\varnothing_{10^{-5}}$	$\varnothing_{10^{-5}}$	$\varnothing_{10^{-5}}$	10^{-9}	10^{-7} / 10^{-6}	10^{-6}
Proteus Kultur Polysacch. 14946/1	$\varnothing_{10^{-2}}$	$\varnothing_{10^{-2}}$	$\varnothing_{10^{-2}}$	10^{-10}	10^{-9}	$\varnothing_{10^{-4}}$

Schwarze Felder: Reizung, bzw. Förderung. Graue Felder: Hemmung. Weiße Felder: Keine Wirkung. Die Dosen werden jeweils in logarithmischen Zehnerpotenzen aufgezeichnet.

Für die Granulomerzeugung sind die Konzentrationen auf 1000 g/Tier bezogen.

Die chemischen Reizstoffe Monojodessigsäure, Ricin, Veratrin und Stickstoffsenfgas zeigen, wie nach den früheren Versuchen von Mettler[19] zu erwarten war, eine hemmende Wirkung auf Leukocyten in Konzentrationen, in denen sie im tierischen Organismus eine lokale Wirkung hervorrufen (10^{-4}). Crotonöl, obwohl kaum wasserlöslich, wirkt stark fördernd.

Hinsichtlich der Wirkungen an Fibroblasten beruhen unsere Feststellungen vorläufig nur auf der Wirkung im akuten Versuch, über

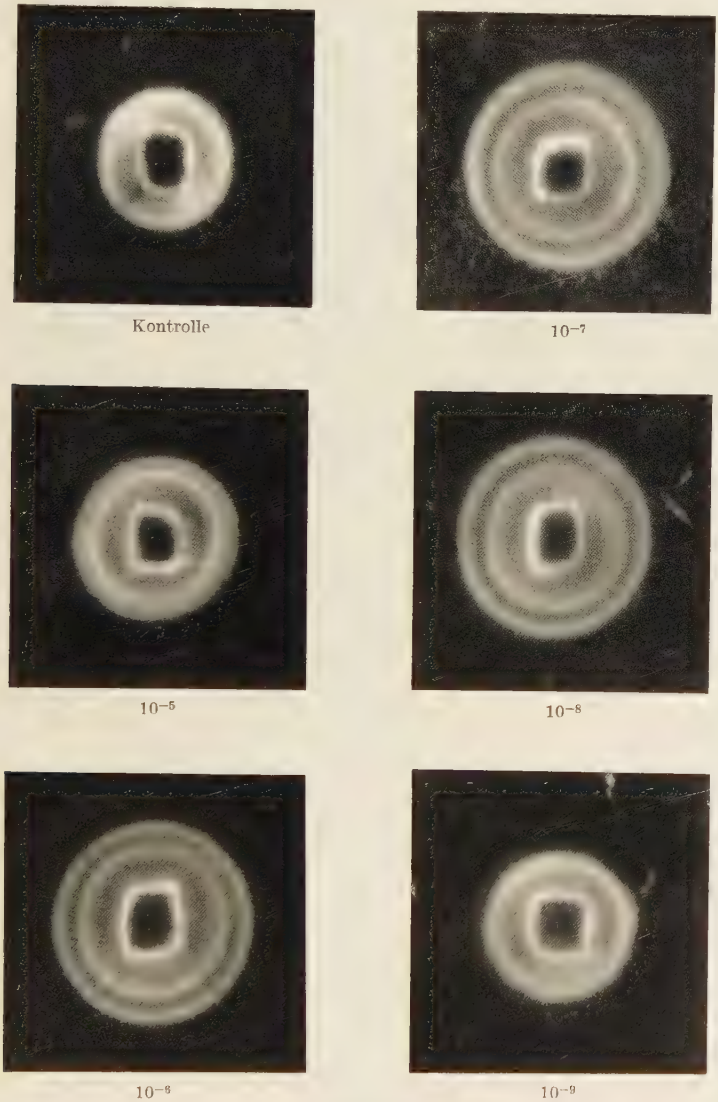


Abb. 1. Wirkung von Proteus Kultur Polysaccharid auf die Leukocytenauswanderung.

Resultate bei mehr „chronischer“ Anwendung in Kulturen werden wir später berichten. Von besonderem Interesse ist, daß das hochwirksame Proteuspräparat und das Shearsche Polysaccharid keine schädigende

Wirkung an Fibroblasten zeigen, eine fördernde Wirkung ist an Fibroblasten in dieser Versuchsanordnung nicht darstellbar. Piromen hat eine deutlich schädigende Wirkung, indem bereits in mittleren Konzentrationen (10^{-6}) nach 8 Std Einwirkungsdauer das Protoplasma der Fibroblasten kaum mehr anfärbbar ist. Die Kerne zeigen Zeichen leichter bis stärkerer Schrumpfung. Diese Wirkungsqualität hat Piromen gemeinsam

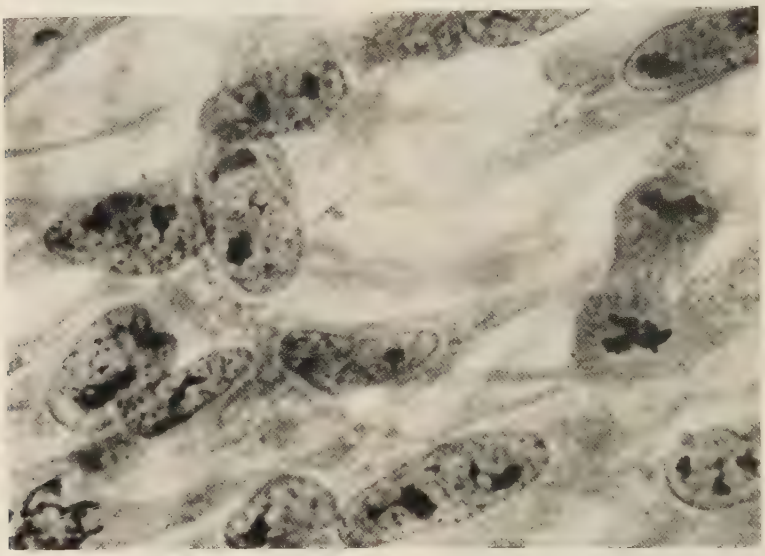


Abb. 2. Mitosen-Untersuchungen an Fibroblastenkulturen. Vergrößerung 1 : 1200. Kontrollen 8 Std nach Überschichten mit Tyrode. Hühnerfibroblasten: Deckglaskulturen. Aussehen normaler Interphasenzellen und Mitosen.

mit Monojodessigsäure (10^{-5}), das ebenfalls primär als Protoplasmagift erscheint. Piromen zeigt somit unter den Bakterienpolysacchariden wiederum seine Besonderheit.

Als Produkte von Mycobakterien wirken die Phosphatide aus Mycobact. smegmatis, Mycobact. phlei und Mycobact. tuberculosis $H_{37}R_v$ nicht auf Fibroblasten, während dasjenige aus Stamm BCG an der Löslichkeitsgrenze eine protoplasmavakuolisierende Wirkung aufweist. Die chemisch definierten entzündungserregenden Stoffe rufen mit Ausnahme des Crotonöles bereits in mittleren Konzentrationen Schädigungen an Fibroblasten hervor. Die Art der schädigenden Wirkung ist in den Schwellenkonzentrationen von durchaus unterschiedlichem Charakter, Stickstoffsenfgas ist ein, wie bereits früher beschrieben, Kerngift von besonderem Typus, aber mit vielseitigem Angriffsmechanismus an der Zelle. Monojodessigsäure zeigt die oben beschriebene Wirkung. Ricin erscheint als Kerngift; während der größte Teil der Ruhezellen in mittleren Konzentrationen ohne sichtbare Schädigung ist, finden sich in der

Kultur Zellen, deren Kernmembran an der Innenseite tropfenartig angelagerte, mit Hämatoxylin stark angefärbte Kernsubstanz enthält.

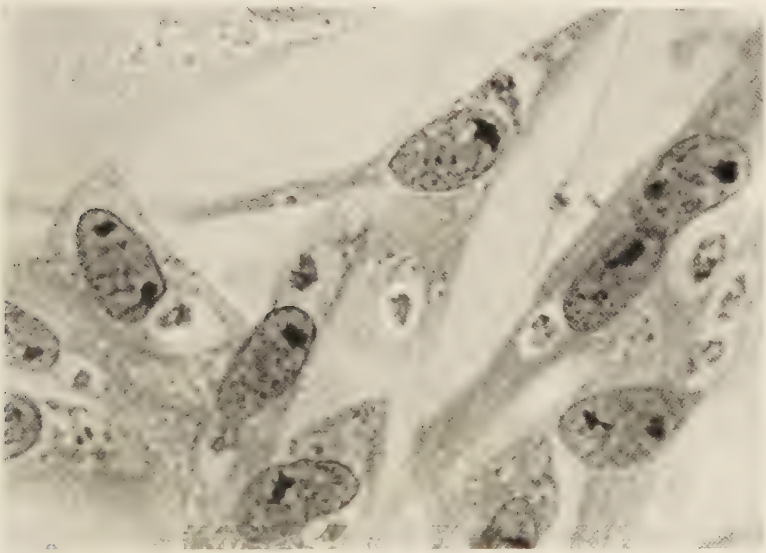


Abb. 3. Veratrin. 10^{-5} nach 8stündiger Einwirkungsdauer. Cytoplasmatische Vakuolisierung mit Einschluß-Körperartigen Gebilden, Kerne unverändert.

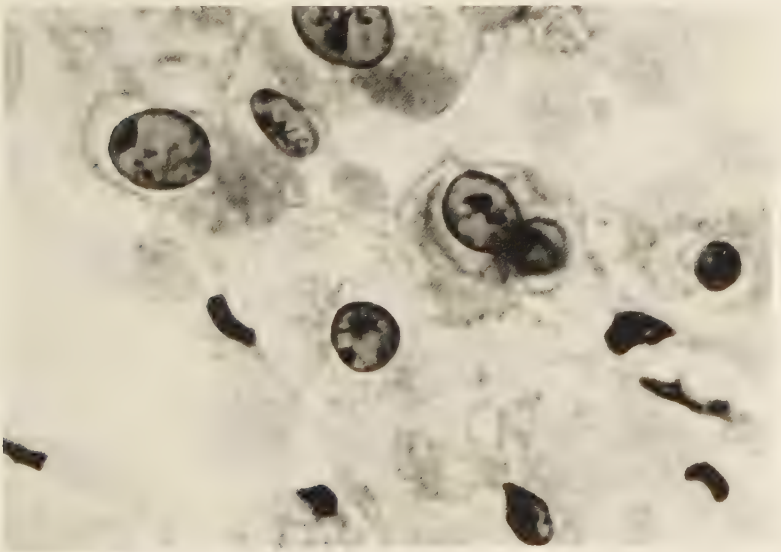


Abb. 4. Monojodessigsäure. 10^{-5} nach 8stündiger Einwirkungsdauer. Ungleichmäßige Auflockerung des Cytoplasmas. Starke fortschreitende Kernschrumpfung mit färberischem Hervortreten der Kernmembran und zum Teil Aufhellung der paranucleolären Gebiete.

Nach Zerfall der Kernmembran bleibt dieses Material in der Zelle verteilt liegen. Normale Zellteilungen fehlen vollständig, Veratrin hat

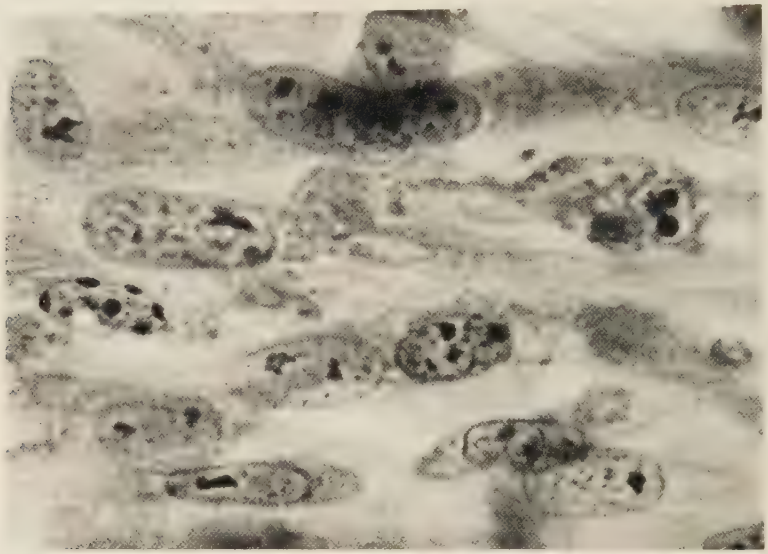


Abb. 5. Ricin. 10^{-5} nach 8stündiger Einwirkungsdauer. Cytoplasma ohne sichtbare Veränderung. An der Peripherie des Kerns beginnende tropfige Degeneration des Chromatins.

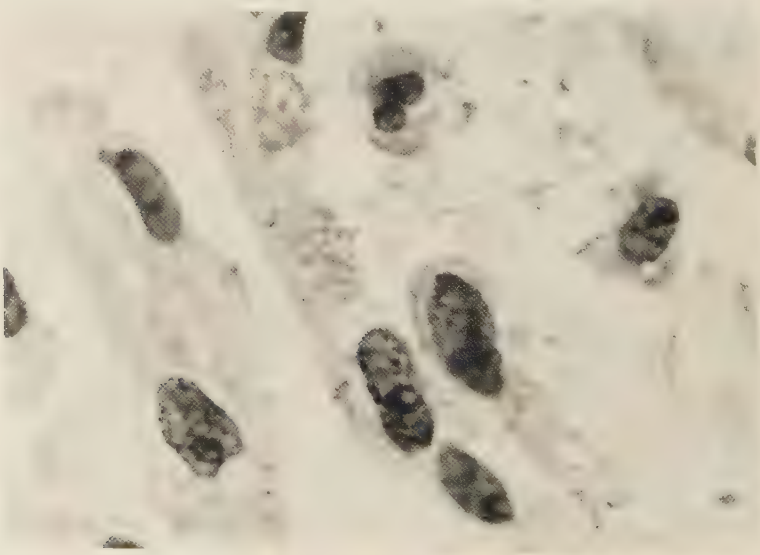


Abb. 6. Piromen. 10^{-6} nach 8stündiger Einwirkungsdauer. Auflockerung der cytoplasmatischen Struktur, mäßige Kernschrumpfung mit gleichmäßiger Verdichtung des Chromatingerüstes.

wiederum einen besonderen Wirkungstypus. An der Grenze der Löslichkeit führt Veratrin zu einer Vakuolisierung des Zellprotoplasmas. Die

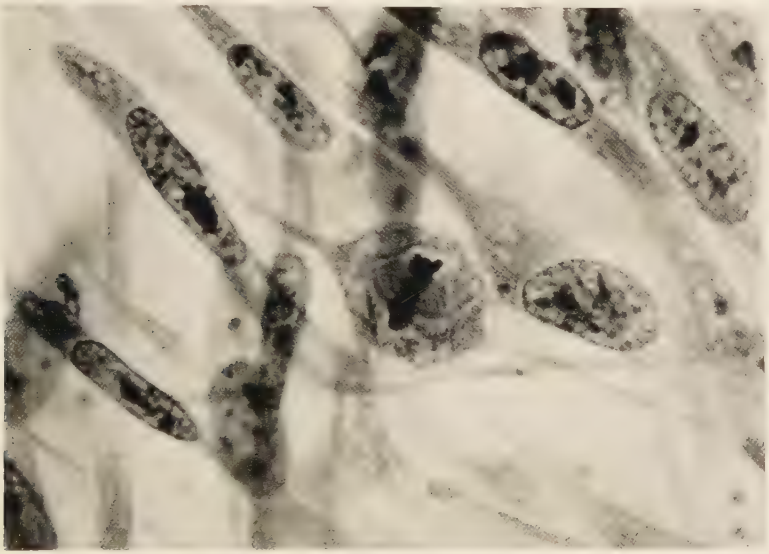


Abb. 7. Shear's Polysaccharid. 10^{-4} nach 8stündiger Einwirkungsdauer. Interphasenzellen und Mitosen ohne Veränderung.

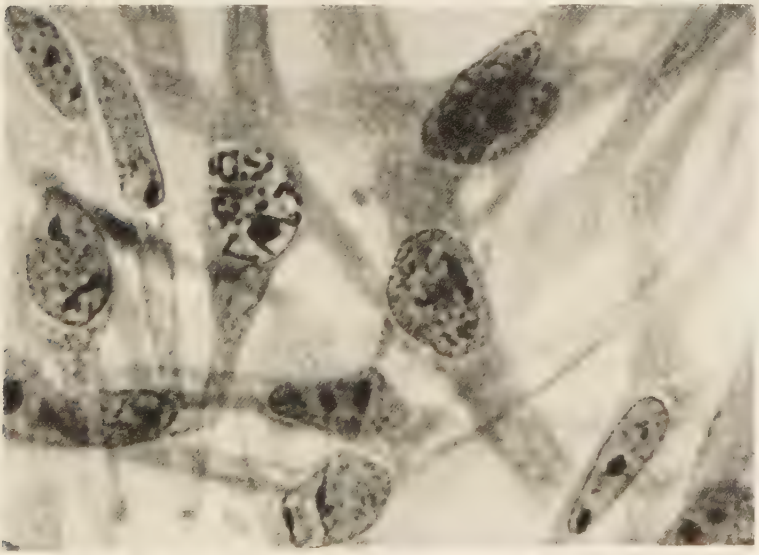


Abb. 8. Proteus Kultur Polysaccharid (14946/1). 10^{-4} nach 8stündiger Einwirkungsdauer. Interphasenzellen und Mitosen ohne Veränderung.

bei Hämatoxylinfärbung farblosen Vakuolen enthalten eine krümelige mitochondrienartige Masse. Crotonöl mit starker Leukocytenemigrationsförderung hat auf Fibroblasten in der beschriebenen Versuchsanordnung keinen morphologisch sichtbaren Einfluß. Dieses gleicht somit in seinem Wirkungstypus den Bakterienpolysacchariden. Was die Konzentrationen der schädigenden Wirkung an Leukocyten und Fibroblasten anlangt, so liegen sie im allgemeinen in der gleichen Größenordnung.

Es ergibt sich somit aus diesen Untersuchungen, daß von den verschiedenen „entzündungserregenden Stoffen" nur bestimmte Bakterienprodukte und Crotonöl an Zellen in vitro keine schädigenden Effekte zeigen, sondern besonders an Leukocyten fördernd wirken.

Es kann auf Grund dieser Befunde somit kein Zweifel bestehen, daß Wirkstoffe, die im Komplex der Entzündungserregung eine Bedeutung haben, sich in ihren Wirkungen auf Zellen in vitro durchaus unterschiedlich verhalten und das nur ausnahmsweise ihre Wirkungen zur „positiven" Zellreaktion im Entzündungsvorgang wie Leukocytenauswanderung, Bindegewebswachstum in direkte Beziehung gebracht werden können.

Es wird deshalb von besonderem Interesse sein zu ermitteln, welche Wirkungen die gleichen Stoffe in „Entzündungstesten" am Tier hervorbringen.

B. Bestimmung der „Reizwirkung" am Kaninchenauge.

Auch hier zeigen die verschiedenen Wirkstofftypen ganz deutliche Unterschiede. Die stark leukocytotaktisch wirksame Proteusfraktion (Präp. 14946/1) ist am Kaninchenauge, selbst in höchsten Konzentrationen, vollständig reizlos. Shears Polysaccharid aus Serratia marcescens zeigt in der hohen Konzentration von 1% eine sehr leichte gefäßerweiternde Wirkung an der Konjunktiva. Was Piromen anbelangt, so haben wir nur kommerzielle Lösungen zur Untersuchung bekommen, die wegen ihrer hohen Verdünnung nur eine Prüfung in Konzentrationen bis zu 10^{-5} ermöglicht haben. In dieser Konzentration war das Präparat ebenfalls vollständig reizlos.

Bei den Phosphatiden und Lipopolysacchariden aus Mycobakterien sowie der unwirksamen Proteusfraktion (Präp. 14644/1) sind die Wirkungen etwas anders. Das aus dem menschlichen Stamm „Brévannes" extrahierte Lipopolysaccharid bewirkt eine Gefäßerweiterung der Konjunktiva in Dosen bis zu $5 \cdot 10^{-3}$, bei 10^{-4} ist die Wirkung unsicher, eine Chemosis ist in Dosen bis zu 10^{-3} nachweisbar. Zwei Phosphatide, das eine aus BCG, das andere aus Mycobact. phlei extrahiert, haben eine leichte Reizwirkung. Das erste bewirkt noch eine Gefäßerweiterung und Chemosis in Konzentration von 10^{-3}, bzw. 10^{-2}, während das zweite nur noch in

Konzentrationen von 10^{-2} sehr leichte Wirkungen zu erzeugen vermag. Die Proteusfraktion 14644/1 hat ebenfalls in Dosen von 10^{-2} leichte Wirkungen auf Gefäßerweiterung und Chemosis.

Ganz andere Wirkungsintensität zeigen aber die chemisch definierten entzündungserregenden Stoffe. Veratrin übt eine gefäßerweiternde Wirkung in Konzentrationen bis zu 10^{-4}; bei 10^{-5} ist die Wirkung unsicher. Chemosis oder Epithelnekrose sind nicht nachweisbar. Stickstoffsenfgas (Dichloren) bewirkt noch in Konzentrationen bis zu 10^{-5} eine deutliche gefäßerweiternde Reaktion an der Konjunktiva; eine Chemosis und eine Epithelnekrose sind in Konzentrationen von etwa 10^{-3} nachweisbar. Die Chemosis beginnt erst wenn die Gefäßerweiterung voll ausgebildet ist und verschwindet sehr langsam erst nach 48 Std Monojodessigsäure übt gefäßerweiternde Wirkungen aus in Konzentrationen, die höher als 10^{-5} liegen, die Chemosis ist sehr stark (in Konzentrationen bis zu 10^{-4} deutlich nachweisbar), die Schwellung ist zunächst rein ödematös, dann eitrig, lang anhaltend. Eine Nekrose ist nur in hoher Konzentration bei etwa 10^{-3} nachweisbar. Crotonöl hat ebenfalls eine sehr starke Wirkung. Eine Gefäßerweiterung der Konjunktiva ist in Konzentrationen bis 10^{-5}, eine Chemosis in solchen von 10^{-5} und eine Epithelnekrose in solchen von 10^{-3} nachweisbar. Die Wirkung von Ricin zeigt ein etwas anderes Bild. Das Präparat wirkt erst nach einer deutlichen Latenzzeit. Gefäßerweiterung ist erst 6 Std nach Präparatapplikation nachweisbar und nach 48 Std noch voll ausgebildet. Chemosis ebenfalls. Beide zeigen noch deutliche Wirkung bei Konzentrationen bis 10^{-4} wie auch die Epithelnekrose, die bei 10^{-4} noch nach 48 Std nachweisbar ist.

Die Befunde mit den chemisch definierten Stoffen entsprechen den in der Literatur beschriebenen, von Interesse ist die deutliche Abhängigkeit der verschiedenen Phänomene von der gegebenen Konzentration und die deutliche Verschiedenartigkeit des Wirkungstypus, auch dann, wenn er aus „analogen" Komponenten zusammengesetzt ist. Die Ausnahmestellung des Veratrins entsprechend den Feststellungen von Heubner ist deutlich[7]. Am auffallendsten ist aber, daß die in vitro an Leukocyten hoch wirksamen Bakterienpolysaccharide keinerlei Reizwirkung ausüben, die Produkte aus Mycobakterien sowie die unwirksamen Proteusfraktionen nehmen eine gewisse Mittelstellung ein, indem sie leichte Reizeffekte in hohen Konzentrationen auszulösen imstande sind.

C. Wirkung auf die Fremdkörpergranulomentwicklung.

Für Versuche, die Reaktion des „Bindegewebes" festzustellen, schien uns am zweckmäßigsten die von uns für die Untersuchung der Nebennierenrindensteroide ausgearbeitete Methode zur Erzeugung des Fremdkörpergranuloms zu sein. Es handelt sich bei dieser Reaktion naturgemäß

auch um einen komplexen Vorgang, an dem Leukocyten, Fibrocyten, Kapillaren beteiligt sind, doch steht die Reaktion des Bindegewebes mit „Grundsubstanzablagerung" und Faserbildung im Vordergrund. Die Wirkung der Stoffe wurde ausschließlich bei lokaler Anwendung fest-

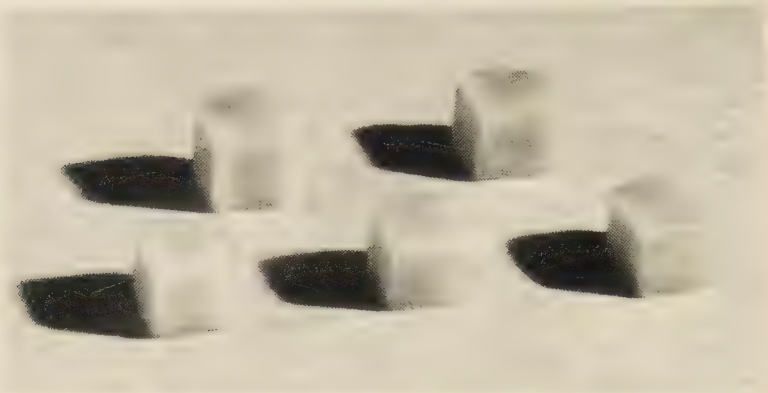


Abb. 9. Fremdkörper-Granulombildung. Kontrollen 5% Davis-Agar-Implantate. 7 Tage nach Implantation.

Abb. 10. Fremdkörper-Granulombildung. Proteus Kultur Polysaccharid (14946/1). 10^{-10}. 7 Tage nach Implantation.

gestellt. Es zeigt sich, daß in ganz ausgesprochener Weise bestimmte Reizstoffe in außerordentlich niederen Konzentrationen bereits stärkstes Granulomwachstum hervorrufen können. Besonders das Ricin ist in dieser Hinsicht von einer auffallend starken Wirkung, insofern es in Konzentrationen von 10^{-9} noch eine Wirkung zeigt. Die anderen chemisch definierten Reizstoffe gruppieren sich in abfallender Reihen-

folge. Crotonöl und Monojodessigsäure haben noch eine deutliche Granulomgewebe fördernde Wirkung bis in Konzentrationen von 10^{-7}. Einen auffallenden Unterschied zeigt aber die Wirkung von Stickstoffsenfgas, das nur in sehr niederen Konzentrationen eine leichte Granulomförderung trotz seiner starken „Hemmwirkung“ am Kaninchenauge, ausübt. In hohen Konzentrationen bewirkt es eine Hemmung des Granulomwachstums. Die Förderung liegt bei der Konzentration von etwa 10^{-6} bis 10^{-7}, die Hemmung bei Konzentrationen bis 10^{-5}. Dieser Stoff zeigt also deutlich zwei ganz verschiedene Wirkungstypen, die hemmende Wirkung kann wohl mit der vielseitigen cytotoxischen in Zusammenhang gebracht, die fördernde Wirkung in ganz kleinen „entzündungserregenden“ Dosen muss auf andere Faktoren zurückgeführt werden.

Besonders auffallend ist auch die Wirkung des Veratrins, das noch in Konzentrationen bis zu 10^{-6} die Granulombildung hemmt und auch in niederen Konzentrationen keine Förderung zu bewirken scheint; dieser Wirkungstyp stellt somit eine Besonderheit dar.

Trotz der gewissen Verschiedenartigkeit der Befunde kann aber aus ihnen geschlossen werden, daß auch Stoffe, die an Zellen in vitro nur schädigende Wirkungen auslösen, stark granulomfördernde Wirkungen ausüben können. Womit dieser Effekt in Zusammenhang steht, wird zu diskutieren sein.

Von den Bakterienprodukten zeigen eine starke Förderung des Granulomwachstums das Proteuspräparat 14946/1 (10^{-10}), das Polysaccharid von Shear (10^{-8}), ebenso Piromen (10^{-9}). Sie sind am stärksten wirksam und gleich der Wirkungsstärke des Ricins, trotzdem sie am Kaninchenauge auch in hohen Konzentrationen keine Reizwirkung ausüben. Es kann somit kein Zweifel bestehen, daß der Wirkungstypus dieser beiden hoch wirksamen Gruppen von Granulomförderern ein differenter sein muß.

Die Wirkung der übrigen Proteusbakterienprodukte wie die Lipopolysaccharide und Phosphatide von Mycobakterien nehmen wiederum eine Mittelstellung ein. Sie sind aber ebenfalls relativ stark granulomfördernd, doch erheblich schwächer als die vorgenannten Bakterienprodukte.

Diskussion der Versuchsergebnisse.

Die Ausdehnung der Bestimmung der Gewebswirkung auf verschiedene Objekte in vitro und in vivo, die in einer differenzierbaren Weise die Wirkung auf Gewebselemente erkennen lassen, hat eine Charakterisierung bestimmter Wirkstofftypen ermöglicht. Es können einfachere Wirkungstypen abgetrennt werden. Besonders eindeutig ist die Wirkung von Bakterienprodukten wie Proteusfraktion

(14946/1) und Shearschem Polysaccharid definiert; sie besitzen leukocytenfördernde (und eventuell Fibroblasten fördernde) Wirkung in vitro, üben keinerlei Reizwirkung aus und rufen trotzdem ein starkes Bindegewebswachstum bei lokaler Applikation am Tier hervor. Wir wollen nicht behaupten, daß der in vitro beobachtete Effekt allein für die Bindegewebsreaktion verantwortlich ist, wir halten es für durchaus möglich, zum mindesten gehen beide Wirkungen in gleicher Richtung, und es sind keine Wirkungskomponenten vorläufig vorhanden, die eine andere Deutung erlauben. Es ist möglich, daß ein spezifischer Wirkungsmechanismus vorliegt, der sich sowohl an isolierten Zellen und am Gewebe des Tieres in rein fördernder Weise auswirkt. Daraus kann wohl auf einen einigermaßen „direkten" Wirkungstyp geschlossen werden, der ein besonderes Interesse verdient.

Bei den chemischen Reizstoffen liegt die Situation durchaus anders. Keiner der vorliegenden Wirkungstypen läßt sich in so einfacher Weise erklären, da bei ihnen zunächst keine eindeutige oder ausschließliche Parallelität zwischen der Wirkung in vitro und in vivo besteht. Es muß wohl daraus geschlossen werden, daß in der Gewebsreaktion „direkte" und indirekte Wirkungskomponenten vorhanden sind. Aber auch sie zeigen einige auffallende Besonderheiten. So bewirkt Veratrin bei ausgesprochener Hyperämiewirkung auffallenderweise eine recht signifikante Granulomhemmung. Ob diese in direktem Zusammenhang mit der Wirkung auf Zellen in vitro steht, bleibt vorläufig unentschieden. Die Stoffe, die eine starke Reizwirkung am Auge ausüben, Ricin, Crotonöl, Monojodessigsäure, haben auch alle eine deutlich granulomfördernde Wirkung, trotzdem die einen auf Zellen in vitro stark schädigend wirken. nur Crotonöl hat in analogen Konzentrationen außerdem eine leukocytenanregende Wirkung bei fehlender Wirkung an Fibroblasten. Stickstoffsenfgas bildet eine weitere Ausnahme, es fördert nur in niederen Konzentrationen die Granulomentwicklung, hemmt sie aber in höheren. was wohl mit dem auch in vitro vorhandenen, besonderen vielseitigen Wirkungstypus in Zusammenhang stehen mag. Bei allen diesen Stoffen muß auf Grund der Vielgestaltigkeit der Wirkung mit direkten und wohl mehreren indirekten Wirkungsteilen gerechnet werden. Somit bleibt besonders der fördernde Effekt auf das Granulomwachstum in seinem kausalen direkten Mechanismus nicht ohne weiteres erklärbar.

Etwas ähnlich wie bei dieser Gruppe liegen die Verhältnisse bei den Phosphatiden und Lipopolysacchariden aus Mycobakterien. Bei ihnen liegt nur teilweise eine Parallelität zur Wirkung an den isolierten Zellen und auch zur Reizwirkung vor, so daß auch bei ihnen vorläufig nicht gesagt werden kann, in welcher Weise der direkte Effekt der vorhandenen Stoffe die Reaktionen am tierischen Gewebe bedingt, oder ob ein anderer, sekundärer Effekt als Ursache der Wirkung aufzufassen ist.

Die auf Grund unserer Ergebnisse gezogenen Schlußfolgerungen belegen wohl eindeutig, daß es notwendig ist, Wirkungskomponenten des Entzündungsvorganges in klarer Weise an Zellen in vitro und am Gewebe in vivo zu charakterisieren, wenn auf Grund der Befunde der im tierischen Organismus beobachtete Effekt als ausschließliche und direkte Folge der angewandten Substanz erkannt werden soll. Ohne eine solche Analyse scheint es vorläufig nicht möglich, die kausale physikalisch-chemische Folge der ablaufenden Vorgänge in klarer Weise zu definieren.

Zusammenfassung.

Es werden die Wirkungen verschiedener entzündungserregender, chemisch definierter Stoffe und Bakterienprodukte an Zellen in vitro, auf Reizwirkung und Wirkung auf das Bindegewebswachstum am Tier untersucht.

Mit einer Ausnahme (Veratrin) bewirken alle untersuchten Stoffe bei lokaler Anwendung eine Förderung des Bindegewebsgranuloms. Am wirksamsten sind einerseits Bakterienpolysaccharide aus Proteus und Serratia marcecens und andererseits Ricin. Stickstoffsenfgas bewirkt nur in niederen Konzentrationen Förderung des Granulomwachstums, in höheren hemmt es dasselbe. Veratrin hemmt die Entwicklung des Bindegewebsgranuloms.

Die fördernden Stoffgruppen lassen sich in 2 Gruppen teilen, solche, die stark chemotaktisch auf Leukocyten wirken, Fibroblasten nicht schädigen und keinerlei Reizwirkungen der Schleimhaut des Auges zeigen — Bakterienpolysaccharide, und solche, die einen gegensinnigen Wirkungstypus aufweisen, Zellen in vitro schädigen und ausgesprochene Reizwirkung an der Schleimhaut zeigen — Monojodessigsäure, Ricin und partiell Stickstoffsenfgas.

Crotonöl nimmt eine Mittelstellung ein, als es sowohl eine starke Reizwirkung, Granulomförderung und die Migration der Leukocyten anregende Wirkung besitzt. Lipopolysaccharide aus Mycobakterien zeigten im allgemeinen deutliche Granulomförderung.

Auf Grund dieser Befunde wird geschlossen, daß nur solche Wirkungen als direkte bei der Auslösung der entzündlichen Reaktion angesehen werden können, die in vitro und in vivo eine übereinstimmende Richtung haben, daß andere Wirkungen aus einem Gemisch von primären und sekundären Effekten zusammengesetzt sind, die in jedem Fall einer besonderen Interpretation bedürfen.

Diese Feststellung hat auch für therapeutische Fragen insofern Bedeutung als angenommen werden kann, daß nur von definierten direkten Wirkungen eindeutige und in bestimmter Richtung gehende Eingriffe in den „Entzündungsablauf" erwartet werden können.

Literatur.

[1] Chambers, R., and C. G. Grand: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **8**, 1 (1936). — [2] Chambers, R., and C. G. Grand: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **9**, 165 (1936). — [3] Delaunay, A., J. Lebrun and M. Barber: Nature (Lond.) **167**, 774 (1951). — [4] Heubner, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **107**, 129, 151 (1925). — [5] Heubner, W.: Klin. Wschr. **1926**, 1. — [6] Heubner, W.: Nachr. d. Akad. d. Wiss. Göttingen Math. Phys. Klasse 1950 (Festschrift Prof. Dr. E. Rost). — [7] Heubner, W.: Klin. Wschr. **1923**, 2037. — [8] Kuna, A., and R. Chambers: J. Clin. Invest. **32**, 5 (1953). — [9] Lasfargues, E., and A. Delaunay: Ann. Inst. Pasteur **73**, 404 (1947). — [10] Marchand, F.: Handb. d. allg. Pathologie Bd. IV: Entzündung. 1924. — [11] Meier, R.: Arch. exper. Zellforsch. **12**, 595 (1931). — [12] Meier, R.: Z. exper. Med. **87**, 283 (1933). — [13] Meier, R.: Forschg. u. Fortschr. **34**, 493 (1933). — [14] Meier, R.:u. B. Schär: Experientia (Basel) **9**, 93 (1953). — [15] Meier, R.: Helvet. chim. Acta **14**, 134E (1941). — [16] Meier, R., W. Schuler u. P. Desaulles: Experientia (Basel) **6**, 469 (1950). — [17] Meier, R., u. B. Schär: Experientia (Basel) (im Druck). — [18] Menkin, V.:Newer concept of Inflammation. Springfield: C. C. Thomas. 1950. — [19] Mettler, R.: Diss. Basel 1946. — [20] Shear, M. J., and F. C. Turner: J. Nat. Cancer Inst. (Bethesda) **4**, 81 (1943). — [21] Silberberg, M.: Virchows Arch. **274**, 820 (1930). — [22] Windle, W. V., and W. W. Chambers: J. Comp. Neur. **93**, 241 (1950).

Professor Dr. R. Meier, Dr. P. A. Desaulles u. Dr. B. Schär,
Wissenschaftl. Laboratorium d. Ciba AG., Basel/Schweiz.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 123—136 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke).

Über den Antagonismus von Kongorot und anderen Substanzen gegenüber quartären Ammoniumbasen.

Von
F. Brücke, W. Kobinger und O. Kraupp.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 29. Juli 1954.)

Im Jahre 1924 beschrieb J. R. Petroff, daß Kongorot sowie einige andere Farbstoffe bei Fröschen sowohl prophylaktisch, als auch in therapeutischen Versuchen die Wirkung eines nicht näher definierten Curarepräparates abschwächen bzw. aufheben konnten. Dieser in der Folgezeit wiederholt untersuchte und bestätigte Antagonismus ist neuerdings (1948) von C. J. Kensler wieder aufgegriffen und mit einem reinen Präparat von d-Tubocurarin genauer verfolgt worden.

Kensler konnte in seiner sorgfältigen Untersuchung die Vermutung Petroffs beweisen, daß Kongorot in vitro eine Verbindung mit d-Tubocurarin eingeht. Wurde nämlich eine Kongorotlösung in bestimmtem molaren Verhältnis mit dem muskellähmenden Stoff versetzt, so fiel eine unlösliche Verbindung aus und die überstehende Flüssigkeit verarmte sowohl an d-Tubocurarin, als auch an Kongorot. Kensler kam daher zur Auffassung, daß die Sulfosäuregruppen des Farbstoffes mit den quartären Stickstoffgruppen des d-Tubocurarins eine Salzbildung eingehen und daß bei Besetzung von immer mehr SO_3-Gruppen diese Verbindungen immer unlöslicher werden. Verschieden substituierte Naphthalinsulfosäuren zeigten dagegen in vitro keine Fällung mit Kongorot. Den Versuchen in vitro entsprachen die Ergebnisse von prophylaktischen Versuchen an Fröschen, die zuerst Kongorot in den Lymphsack eingespritzt bekamen und dann geringere Lähmung auf d-Tubocurarin zeigten, oder auch Versuche an isolierten Froschmuskeln (rectus abdominis), deren Ansprechbarkeit auf Acetylcholin in Anwesenheit von Kongorot weit schwächer durch d-Tubocurarin blockiert werden konnte. An ganzen Fröschen konnte die Curarelähmung durch Kongorot auch therapeutisch verkürzt werden. In allen derartigen Versuchen waren Naphthalinsulfosäuren ohne Wirkung, so daß Kensler wie vor ihm auch Petroff annehmen, daß die Größe des Moleküls bei den gegen Curare wirksamen meist kolloid gelösten Farbstoffen eine Rolle spielt. Eine Art Mittelstellung in Kenslers Versuchen nahm Methylorange ein, welches zwar in vitro zu einer unlöslichen Verbindung mit d-Tubocurarin zusammentrat, jedoch in vivo fast keine Anticurarewirkung hatte.

Bei der vielfachen Verwendung welche quartäre Ammoniumverbindungen mit den ihnen eigentümlichen pharmakologischen Wirkungen gegenwärtig in der Medizin haben, schien es uns zunächst interessant, die Kongorotversuche auf synthetische muskellähmende Stoffe von

mehr „depolarisierendem" Charakter auszudehnen und dabei auch andere kolloidale, mit Sulfonsäuregruppen substituierte Stoffe (z. B. Germanin) in die Betrachtung mit einzubeziehen[1].

In den im folgenden beschriebenen Versuchen arbeiteten wir hauptsächlich mit Warmblütermuskeln, da uns an derartigen Präparaten die Möglichkeit geboten schien, gegebenenfalls auch sehr schwache antagonistische Wirkungen festzustellen, die in Versuchen an Fröschen der Beobachtung entgangen sein konnten.

Methodik.

Die ersten Versuche über den Antagonismus zwischen Kongorot und quartären Ammoniumbasen wurden von uns an *isolierten Phrenicus-Zwerchfellpräparaten von Ratten* nach E. Bülbring mit einer von Taugner und Fleckenstein modifizierten Tyrodelösung angestellt, wobei mit supramaximalen Rechteckstromstößen einer Frequenz von 6 pro min gearbeitet wurde. Dabei wurden die Zwerchfelle zuerst durch Zusatz der lähmenden Stoffe auf etwa 10—30% der Anfangsspannung gelähmt. Wenn die Lähmung ihr Maximum erreicht hatte und nun eine zeitlang konstant blieb, wurden die Antagonisten zugesetzt. Das Ringer-Bad faßte 50 cm³. Bei dieser Anordnung blieben die lähmenden Stoffe dauernd in Kontakt mit dem Präparat, so daß eine Spontanerholung normalerweise nicht eintrat. Auch beim Zusatz der Antagonisten wurde die Badeflüssigkeit nicht gewechselt.

Als günstiger erwies sich in weiteren Versuchen ein *Nervmuskelpräparat an der mit Urethan (1 g/kg) narkotisierten Ratte.* Hierzu wurde der Ischiadicus einer Seite freigelegt, zentral abgebunden oder gequetscht und an das periphere Ende eine gedeckelte Silberdrahtelektrode fixiert. Die Reizung erfolgte mit Hilfe eines Reizgerätes durch Rechteckstromstöße von 5 msec Dauer und 2—6 mAmp Stärke im Abstand von 10 sec. Hierbei trat die Ermüdung so langsam ein, daß die Versuche bis zu 2 Std ausgedehnt werden konnten. Das Mechanogramm wurde vom m. gastrocnemius durch Befestigen der Achillessehne an einem Torsionsdrahtmyographen auf dem Russkymographion registriert. Während des Versuches wurden die Tiere mit einer Atempumpe für Kleintiere durch eine Trachealkanüle künstlich beatmet; die Testsubstanzen wurden mit einer Hahnkanüle in die v. jugularis injiziert. Hierbei wurde der Muskel vollständig oder zumindest auf 10—20% seiner Anfangsspannung gelähmt. Die Antagonisten wurden entweder im Höhepunkt der Lähmung oder zu Beginn der spontanen Erholung i.v. verabreicht, wobei sich bei wirksamen Substanzen jedesmal eine deutliche Stufe am Mechanogramm ausbildete. Die Wirkung der lähmenden Stoffe ohne Antagonistenzusatz war jedesmal in Vorversuchen genau bestimmt worden.

Ähnliche Versuche wurden für Kongorot auch am *m. quadriceps der Katze* bei Reizung des n. femoralis angestellt, die Narkose erfolgte hier mit Chloralose (80 mg/kg). In diesen Versuchen wurde auch gleichzeitig der Blutdruck manometrisch registriert.

Die Versuche am *musculus rectus abdominis des Frosches* wurden in der Anordnung nach Chang und Gaddum durchgeführt. Untersucht wurde der Einfluß von Kongorot und Anilinblau auf die durch Einwirkung von Hexamethylenbiscarbaminoylcholin[2] (BC 16) hervorgerufene Kontraktur des Muskels (Klupp u. Mitarb.). Hierbei wurde BC 16 im Abstand von 5 min durch je 30 sec auf den Muskel zur

[1] Für Germanin (Moranyl) hat bereits D. Bovet den Antagonismus gegen Succinylbischolin beschrieben.

[2] „Imbretil" der österreichischen Stickstoffwerke Linz a. d. Donau.

Einwirkung gebracht, bis die einzelnen Kontrakturen eine konstante Höhe erreicht hatten. Nun wurde Kongorot in Konzentrationen von 10—200 μg/cm³ und Anilinblau in Konzentrationen von 300 μg bis 2 mg/cm³ zugesetzt und nach 3 min Einwirkungsdauer entfernt. Unmittelbar darnach wurde BC 16 in gleicher Konzentration und Einwirkungsdauer wie im Leerversuch zugesetzt und die Wirkung der Antagonistenvorbehandlung an der nunmehr eingetretenen Veränderung der Kontrakturhöhe festgestellt.

Als muskellähmende Stoffe verwendeten wir neben reinem d-Tubocurarinchlorid, Dekamethoniumbromid und den zuerst von Cheymol sowie von uns beschriebenen langanhaltend muskellähmenden Stoff Hexamethylenbiscarbaminoylcholin-jodid[1] (im nachstehenden als BC 16 bezeichnet).

Als Antagonisten wurden verwendet: Kongorot 2%ig in 4%iger Dextroselösung, Germanin 10%ig in physiologischer Kochsalzlösung, Na-α-Naphthylamin-4-sulfonat (Naphthionin) 10%ig in aqua bidestillata, 1%ige Sulfanilsäure in glucosefreier Tyrode mit NaOH auf p_H 7,0 neutralisiert. Anilinblau der Firma Grübler, Leipzig, 3%ig in physiologischer Kochsalzlösung.

Für die Versuche an Froschmuskeln wurden alle Stoffe in Frosch-Ringer gelöst. Sämtliche Dosen im Rattenversuch sind im nachstehenden pro 100 g Ratte, bei Katzen pro kg zu verstehen.

Ergebnisse.

1. Versuche am Zwerchfell der Ratte. Der von Petroff beobachtete Antagonismus zwischen Curare und Kongorot konnte zunächst am Rattenzwerchfell gut verfolgt werden. So lähmten z. B. in einem Versuch 110 μg d-Tubocurarin in 2 Dosen gegeben das Zwerchfell bis auf geringe Kontraktionen von 2—3% der Ausgangsspannung. Hierauf wurden zunächst 5 mg Kongorot zugesetzt und die beginnende Erholung des Mechanogrammes beobachtet. Diese erfolgte sehr langsam und gleichmäßig, jedenfalls langsamer als nach Zusatz von Eserin. Nach 10 min waren Kontraktionen von 25% der Ausgangsspannung erreicht, bei weiterem Zusatz von 5 mg Kongorot konnten nach weiteren 10 min 33% der Anfangsspannung ohne deutliche zweite Stufe erreicht werden.

Ähnliches konnte auch mit Dekamethonium beobachtet werden: 1 mg dieser Substanz lähmte in 7 min das Zwerchfell bis auf 20% des Ausgangswertes. 1 min, 10 min und 25 min nach Erreichung der maximalen Lähmung wurden je 3 mg Kongorot und 4 min später nochmals 10 mg des Farbstoffes zugesetzt. Dabei trat eine stetige aber langsame Erholung der Muskelkontraktionen ein, die nach 50 min zwei Drittel des Ausgangswertes erreichte.

Noch ausgeprägter ist der Antagonismus gegenüber BC 16.

2. Versuche am Rattengastrocnemiuspräparat. Besonders schön läßt sich der Antagonismus am Rattengastrocnemius bei normaler Durchblutung des Muskels und i.v. Verabreichung der lähmenden und antagonistischen Stoffe zeigen:

So konnte z. B. in einem Versuch durch Verabreichung von 20 μg d-TC/100 g bei einer Ratte der m. gastrocnemius vollständig gelähmt

werden. Nach 6 min völliger Lähmung wurden 5 mg/100 g Kongorot verabreicht, worauf in einer Zeit von etwa 40 sec in einer Stufe Kontraktionshöhen von maximal 15% des Ausgangswertes erreicht wurden. Eine zweite Injektion der gleichen Kongorotmenge führte in einem steilen Anstieg in 2 min zu einer Erholung auf 77% und auf eine weitere Injektion von abermals 5 mg Kongorot erfolgte dann innerhalb 10 min eine völlige Erholung. Sehr deutlich ausgesprochen war auch der Antagonismus gegenüber Dekamethonium. So wurde z. B. in einem Versuch vom 25. 3. 1954 bei einem Rattenpräparat 100 μg/100 g Dekamethonium gegeben, worauf in $1\frac{1}{2}$ min eine Lähmung des Muskels auf 27% der Ausgangsspannung erfolgte, danach trat langsame Spontanerholung ein, wobei innerhalb 10 min nach dem Maximum der Lähmung 70% der Ausgangsspannung erreicht wurden. Hierauf wurde neuerlich

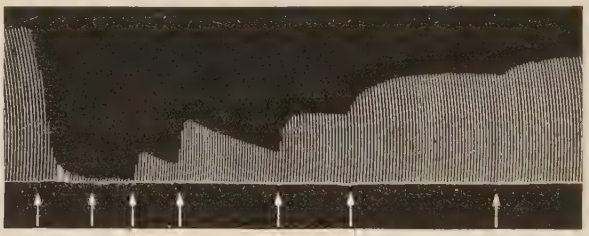


Abb. 1. Ratte 250 g, Urethannarkose, Ischiadicus-Gastrocnemiuspräparat. Reizfolge 6 min. Wirkung von Kongorot (Ko) auf die neuromuskuläre Lähmung durch BC 16. Dosen pro 100 g Tier.

Dekamethonium in der gleichen Dosis verabreicht und damit eine nahezu völlige Lähmung in etwa 2 min erzielt. Nach 3 min wurde bei völliger Lähmung einmal 8 mg/100 g Kongorot gegeben, worauf die Kurve sofort eine kräftige Erholung zeigte, so daß in einer Stufe nach 2 min die Kontraktionen sich über die Ausgangsspannung vor der zweiten Dekamethoniuminjektion erholt hatten und auf 90% der Anfangsspannung konstant blieben. Ein ähnliches Verhalten wurde in 3 weiteren Versuchen beobachtet.

Deutlich, aber nicht so stark war auch der Antagonismus zwischen Kongorot und BC 16. (Abb. 1 zeigt dieses Verhalten, das ohne weitere Erklärung verständlich ist.)

Nach Kontrollversuchen ohne Kongorot war nach einer derartig vollständigen Lähmung durch BC 16 die volle Erholung erst nach 40 min zu beobachten, wobei die Ausgangshöhe meist nicht mehr ganz erreicht wurde. Im Versuch der Abb. 1 sieht man deutlich, daß die beiden ersten Erholungsstufen nach 16 und 24 mg/100 g Kongorot nicht zu einer dauernden Erholung führten, sondern nach Erreichung eines Kontraktionsmaximums trat offenbar zugleich mit der Einstellung eines Gleichgewichtszustandes zwischen lähmendem Gift und Antagonisten ein partieller Rückfall in die Lähmung ein. Erst von der vierten Injektion an blieb dieser Rückfall

aus und nach der sechsten Injektion, die immer noch eine erkennbare Erholungsstufe hervorrief, wurde eine Kontraktionshöhe von 81% des Ausgangswertes erreicht. Ein zweiter Versuch bestätigte dieses Ergebnis.

Der Antagonismus von Germanin (Bayer 205) gegenüber d-TC ist kaum geringer als der des Kongorots: So erholte sich in einem Versuch vom 7. 5. 1954 der Rattengastrocnemius, der durch 15 μg/100 g d-TC fast völlig (auf 2% der Anfangsspannung) gelähmt war, nach einer einmaligen Dosis von 10 mg/100 g Germanin im Verlauf von etwa 10 min in steilem Anstieg auf 89% der Anfangsspannung. Nicht ganz so deutlich, aber doch sehr auffällig ist auch der Antagonismus des Germanins gegenüber Dekamethonium und BC 16. Wieder war bei mehrfachen Injektionen von je 10 mg/100 g Germanin eine stufenweise Erholung zu sehen, wobei gelegentlich eine nochmalige Rückkehr in die Lähmung beobachtet wurde. Wenn größere Dosen von Germanin (20 mg/100 g)

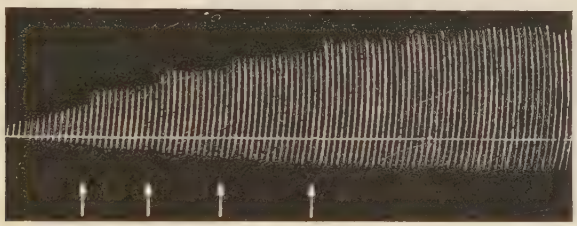


Abb. 2. Ratte 200 g, Urethannarcose, Ischiadicus-Gastrocnemiuspräparat. Reizfolge 6 min. Wirkung von sulfanilsaurem Natrium (Sulf.) auf den Erholungsverlauf nach einer neuromuskulären Lähmung durch BC 16. Der Muskel wurde durch 60 μg BC 16 auf 9% der Anfangsspannung gelähmt. Die Abbildung zeigt die darauffolgende Erholung und deren Beeinflussung durch 4malige intravenöse Injektion durch sulfanilsaures Na. Dosen pro 100 g.

auf einmal bei einem Tier injiziert wurden, dessen Muskulatur sich gerade spontan von einer Lähmung zu erholen begann, trat gelegentlich in wenigen Sekunden volle Wiederherstellung der Anfangsspannung ein.

Im Gegensatz zu den Befunden von Kensler fanden wir an diesem Warmblüterpräparat auch kleinere Moleküle als Antagonisten gegen muskellähmende Stoffe wirksam. Um diese Wirkung deutlicher zu beobachten, ist es allerdings zweckmäßig, entweder die muskellähmenden Stoffe so zu dosieren, daß keine vollständige Lähmung erreicht wird, oder solange zu warten, bis die Spontanerholung einsetzt und dann erst den Antagonisten zu injizieren. Wir sahen z. B. eine deutliche stufenweise Erholung eines mit d-TC gelähmten Rattengastrocnemius nach Injektion von 4mal je 10 mg/100 g Na-α-naphthylamin-4-sulfonat. Einen ebenfalls deutlichen Antagonismus beobachtet man zwischen dieser Substanz und dem lange muskellähmenden BC 16. Dagegen ist der Antagonismus gegenüber Dekamethonium nur schwer nachzuweisen

(4 Versuche): Meist waren nur die ersten Zuckungen nach der Injektion des Antagonisten deutlich etwas stärker, jedoch fielen sie bald auf das Niveau der Spontanerholung wieder zurück.

Neutralisierte Sulfanilsäure hat gegenüber allen untersuchten muskellähmenden Stoffen nur eine äußerst geringe antagonistische Wirkung, die jedoch immer noch nachweisbar war, wie aus Abb. 2 zu ersehen ist.

Während nun alle bisher untersuchten Antagonisten sowohl aromatische Ringsysteme, als auch daran gekuppelte Amino- und Sulfonsäuregruppen enthalten, ist dies bei Anilinblau, welches bereits Petroff verwendete, nicht der Fall. Dieser Farbstoff (Triphenylfuchsinchlorhydrat) hat nur aromatische NH_2-Gruppen, enthält jedoch keine Sulfonsäuregruppen und ist daher ein basischer Farbstoff. Entsprechend den Befunden von Petroff bei Fröschen, ließ sich mit Anilinblau an Ratten ein überraschend guter Antagonismus gegenüber d-TC feststellen (Abb. 3). Gegenüber C_{10} und BC 16 ist der Antagonismus des Anilinblaus viel schwächer, aber immer noch etwas deutlicher ausgeprägt als der des „Naphthionins".

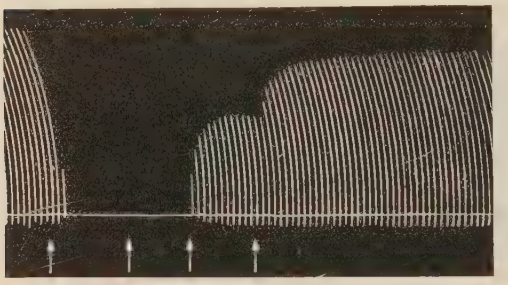
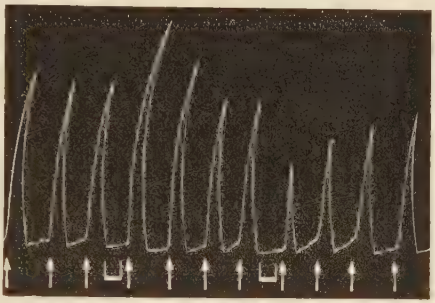


Abb. 3. Ratte 250 g, Urethannarkose, Ischiadicus-Gastrocnemiuspräparat. Reizfolge 6 min. Wirkung von Anilinblau auf die neuromuskuläre Lähmung durch d-Tubocurarin. Dosen pro 100 g.

3. Versuche am m. quadriceps der Katze. In 2 orientierenden Versuchen am m. quadriceps der Katze (siehe Methodik) haben wir sowohl gegenüber der lähmenden Wirkung von Dekamethonium als auch gegenüber der viel länger anhaltenden Lähmung durch BC 16 den Antagonismus mit Kongorot verfolgt, wobei i.v. Einzelinjektionen von je 40 mg/kg Kongorot verwendet wurden. Die Erholung trat bei einer durch 40 µg Dekamethonium/kg erzielten nahezu vollständigen Lähmung nach insgesamt 80 mg Kongorot/kg ein. Bei einer kompletten Lähmung durch 8 µg/kg BC 16 wurden zu einem etwa gleichen Erfolg 120 mg/kg Kongorot gebraucht. Die Blutdruckwirkung solch hoher Dosen Kongorot bestand stets in einer deutlichen Erniedrigung des Druckes, wobei gelegentlich Bradykardie und Herzunregelmäßigkeiten auftraten.

4. Versuche am m. rectus abdominis des Frosches. Als kontrakturauslösende Substanz wurde neben Acetylcholin nur BC 16 verwendet, und zwar Acetylcholin in Konzentrationen von 0,5 µg bis 1,0 µg/cm³ und BC 16 in Konzentrationen von 2—3 µg/cm³. In jedem Fall wurden beide Substanzen so oft hintereinander gegeben, bis die anfänglich etwas

höheren Kontrakturen einen konstanten Wert erreicht hatten. Setzte man nun der Badeflüssigkeit Kongorot in einer Endkonzentration von etwa 10 μg/cm³ zu, dann trat (Abb. 4) in den meisten Fällen eine Steigerung der Kontrakturhöhe um 20—40% des Ausgangswertes ein. Konzentrationen von etwa 30 μg/cm³ zeigten kaum Wirkungen, dagegen war bei Konzentrationen über 50 μg/cm³ stets eine Verminderung der BC16-Kontraktur zu beobachten (Abb. 4).



Ko. 10 μg/cm³ Ko. 70 μg/cm³

Abb. 4. Froschrectus, Wirkung von Kongorot auf die BC 16 Kontraktur. Bei ↓ 2 μg/cm³ BC 16 für die Dauer von 30 sec. Zwischen den einzelnen Kontrakturen 5 min Pause. Bei KO 10 bzw. 70 μg/cm³ Kongorot, 3 min Einwirkungsdauer.

Anilinblau hatte in allerdings weit höheren Konzentrationen (300—600 μg/cm³) bei der von uns gewählten Anordnung ebenfalls eine kontrakturSteigernde Wirkung gegenüber BC 16. Dagegen schwächte es bei sehr hohen Dosen (1—2 mg/cm³) die Kontrakturwirkung des BC 16 ab. Allerdings wurde hierduch anscheinend die Empfindlichkeit des Muskels dauernd geschädigt, so daß dieser auch nach wiederholtem Auswaschen nicht mehr die anfängliche Kontrakturhöhe nach BC 16 erreichte. Die Acetylcholinkontraktur wurde durch 300 μg/cm³ Anilinblau um etwa 20% des Ausgangswertes erhöht.

Versuche in vitro.

Wir haben Kenslers Versuche in vitro wiederholt und sie auf Dekamethonium und BC16 ausgedehnt. Außerdem wurden ähnliche Versuche statt mit Kongorot auch mit Germanin, Naphthionin, Sulfanilsäure und Anilinblau durchgeführt.

Zu diesem Zwecke wurden je 5 cm³ einer Lösung von Kongorot bzw. Germanin sowie der anderen untersuchten Substanzen in m/15 Phosphatpuffer von p_H 7,4 mit verschiedenen in einer geometrischen Reihe liegenden Volumina von Lösungen je eines der drei Muskelrelaxantien in m/15 Phosphatpuffer von p_H 7,4 versetzt und die entstandenen Mischungen mit Phosphatpuffer auf 10,0 cm³ aufgefüllt.

Die Endkonzentrationen an Kongorot, Germanin, Naphthionin, Sulfanilsäure und Anilinblau betrugen in den meisten Versuchen 0,153 mM/l, in einzelnen Versuchsreihen jedoch auch 0,765 bzw. 1,53 mM/l. Die Endkonzentrationen der drei verwendeten Muskelrelaxantien waren in den einzelnen Versuchsreihen stets ganzzahlige Bruchteile bis ganzzahlige Vielfache der in den gleichen Ansätzen verwendeten Konzentrationen von Kongorot bzw. der anderen untersuchten Antagonisten.

Die Ansätze blieben 24 Std bei Zimmertemperatur stehen; hernach wurde der Grad der Ausflockung in den einzelnen Proben festgestellt. Bei den beiden Farbstoffen Kongorot und Anilinblau geschah dies durch Abzentrifugieren des Präcipitates und colorimetrische Bestimmung des Farbstoffgehaltes in der überstehenden

Flüssigkeit. Die colorimetrische Bestimmung erfolgte mit dem Pulffrich-Photometer unter Verwendung der Filter S 50 (Kongorot) und S 57 (Anilinblau) durch Vergleich der Farbintensität mit Lösungen bekannten Farbstoffgehaltes in m/15 Phosphatpuffer (p_H 7,4) in einer Schichtdicke von 0,5 cm bzw. bei geringer Farbintensität in einer Schichtdicke von 1,0 und 2,0 cm. Der so ermittelte Farbstoffgehalt wurde von dem ursprünglichen Farbstoffgehalt des Versuchsansatzes abgezogen und auf diese Weise die Menge des ausgefällten Farbstoffes bestimmt.

Da diese Methode für das ungefärbte Germanin nicht anwendbar war, wurden die entsprechenden Proben nach 24 Std abzentrifugiert und zur überstehenden Flüssigkeit neuerlich das verwendete Muskelrelaxans zugesetzt, wobei das Ausbleiben einer weiteren Fällung die komplette Ausfällung des Germanins anzeigte. Bei Naphthionin und Sulfanilsäure konnte in den verwendeten Konzentrationsbereichen weder mit d-TC noch mit Dekamethonium und BC 16 eine Ausfällung beobachtet werden.

Ergebnisse.

1. Ausfällung des Kongorotes durch Zusatz von d-TC, Dekamethonium und BC 16. Mit der oben näher beschriebenen Versuchsanordnung konnten wir feststellen, daß Kongorot in einer Konzentration von 0,153 mM/l durch d-TC in Konzentrationen von 0,03—0,306 mM/l in steigendem Maße ausgefällt wird. Eine vollständige Ausfällung des Kongorotes wurde hierbei bei einer d-TC-Konzentration von 0,153 mM/l (molares Verhältnis d-TC:Kongorot = 1:1) erreicht. Unter Einhaltung der gleichen Konzentrationsverhältnisse konnten wir somit die Ergebnisse von Kensler über die Ausfällung von Kongorot durch d-TC bestätigen. Dekamethonium und BC 16 führten in derselben Versuchsanordnung wie bei d-TC ebenfalls zu einer Ausfällung des Kongorotes, deren Ausmaß gleichfalls von dem Verhältnis der angewandten Konzentration der beiden Muskelrelaxantien zu der des Kongorots abhängig war. Die genauen quantitativen Ergebnisse dieser Versuche sowie des d-TC-Versuches sind in Abb. 5 wiedergegeben. Die erhaltenen Ausfällungskurven des d-TC und des Dekamethoniums zeigen einen gleichartigen S-förmigen Verlauf und erreichten bei der Abszissenkonzentration 0,153 mM/l (molares Verhältnis zu Kongorot 1:1) auf der Ordinate als Zeichen der vollständigen Ausfällung die zu Anfang des Versuches in den Ansätzen vorhandene Menge des Kongorotes von 0,153 mM/l. BC 16 zeigte ein von den beiden vorgenannten Substanzen insofern abweichendes Verhalten, als die Ausfällung des Kongorotes nur bis zu einer BC 16-Konzentration von 0,076 mM/l (molarem Verhältnis BC 16:Kongorot 1:2) einen ähnlichen Verlauf wie bei d-TC und Dekamethonium nahm, so daß insgesamt nur 68% der ursprünglich in den 10 cm^3 des Versuchsansatzes enthaltenen 1,53 μM des Kongorotes ausgefällt werden konnten. 32% der ursprünglichen Menge Kongorot blieben auch nach weiterer Steigerung der BC 16-Konzentration bis zum molaren Verhältnis 2:1 weiterhin in Lösung.

Eine Erklärung dieses Verhaltens könnte möglicherweise darin liegen, daß die der Ausfällung zugrunde liegende Komplexverbindung des Kongorotes mit BC 16

unterhalb einer Konzentration von 0,046 mM/l löslich ist. Zur Überprüfung dieser Vermutung wiederholten wir die Versuchsreihe mit einer 5fach höheren Ausgangskonzentration an Kongorot (0,765 mM/l), wobei die Zusätze an BC 16 ebenfalls in

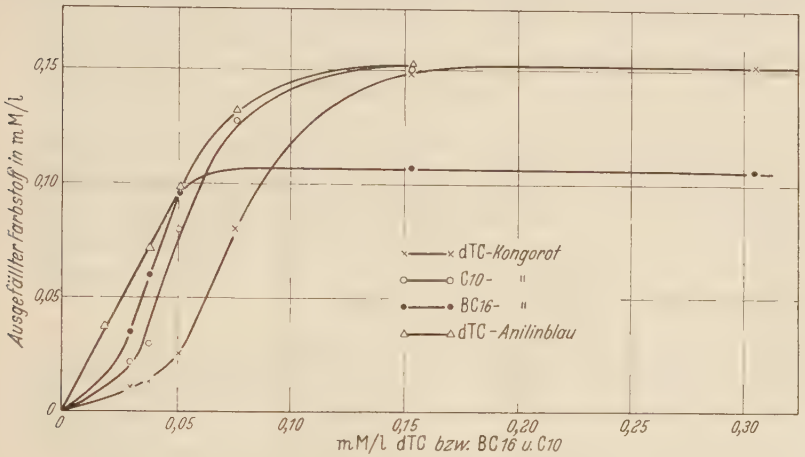


Abb. 5. Ausfällung des Kongorots bzw. Anilinblaus bei einer Anfangskonzentration von 0,153 mM/l nach Zusatz von d-TC, C 10 und BC 16. Ordinate: ausgefällter Farbstoff in mM/l Abszisse: Anfangskonzentration der Muskelrelaxantien in mM/l.

5facher Höhe des vorigen Versuches erfolgten. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 6 wiedergegeben. Die Ausfällungskurve zeigt wiederum zunächst einen sehr steilen Verlauf. Bei einer BC 16 Konzentration von 0,765 mM/l (molares Verhältnis BC 16: Kongorot 1 : 1) waren 0,643 μM Kongorot (d. s. 84% der ursprünglich in Lösung vorhandenen Menge) ausgefällt. Von dieser Konzentration an nahm die Ausfällungskurve einen sehr flachen Verlauf, so daß bei einer BC 16-Konzentration von 3,0 mM/l (molares Verhältnis BC 16: Kongorot 4 : 1) noch immer 0,77 μM Kongorot in Lösung und nur 90% des ursprünglich vorhandenen Kongorotes ausgefällt worden waren. Die Tatsache, daß in diesem Versuch selbst bei einem 4 fach molaren Überschuß von BC 16 noch immer Kongorot in Lösung blieb, wobei die nach der Ausfällung in der Lösung auftretenden Kongorotkonzentrationen bei beiden Versuchen trotz verschiedener Kongorotausgangskonzentrationen (0,153 und 0,765 mM/l) in gleicher Größenordnung lagen, bekräftigt die Vermutung, daß die zwischen Kongorot und BC 16 gebildete Komplexverbindung bis zu einem gewissen Grade löslich ist.

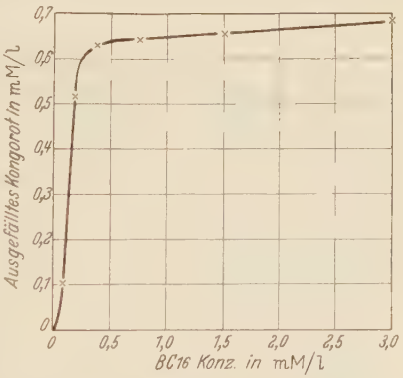


Abb. 6. Ausfällung des Kongorots bei einer Anfangskonzentration von 0,765 mM/l nach Zusatz von BC 16. Ordinate: ausgefällter Farbstoff in mM/l. Abszisse: Anfangskonzentration des BC 16 in mM/l.

2. Ausfällung des Germanins durch Zusatz von d-TC und BC 16. Mit dem in der Methodik angegebenen qualitativen Verfahren konnten

wir feststellen, daß Germanin in der gleichen Konzentration wie die des Kongorots in den d-TC-Versuchen durch d-TC ausgefällt werden kann. Allerdings trat bei Germanin zum Unterschied zu dem analogen Kongorotversuch eine komplette Ausfällung erst bei einem molaren Konzentrationsverhältnis d-TC: Germanin von 4:1 ein. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Befunden Kenslers, wonach Evans Dye unf Chikago Blue ebenfalls erst bei einem molaren Verhältnis von 4:1 durch d-TC ausgefällt wurden, da sowohl Germanin wie auch Evans Dye und Chikago Blue doppelt bis 3fach soviel basen-bindende Sulfosäuregruppen als Kongorot enthalten. Im Gegensatz zu d-TC führte BC 16 selbst bei Verwendung einer 10fach konzentrierten stärkeren Konzentration (1,53 mM/l) an Germanin bis zu einem 4-molaren Überschuß zu keiner Ausfällung des Germanins.

3. Versuche über die Ausfällung von Naphthionin und Sulfanilsäure durch Zusatz von d-TC und BC 16. Naphthionin und Sulfanilsäure wurden bis zu einer Konzentration von 1,53 mM/l und bei Anwendung eines 4fach molaren Überschusses der beiden Muskelrelaxantien weder durch d-TC noch durch BC 16 ausgefällt.

4. Versuche über die Ausfällung von Anilinblau durch Zusatz von d-TC und BC 16. BC 16 und Anilinblau gaben bis zu einer Gesamtkonzentration von 1,53 mM/l Anilinblau und einem doppelt molaren Überschuß von 3,06 mM/l BC 16 keinerlei nachweisbare Fällung. Hingegen trat nach Zusatz von d-TC schon bei einer Anilinblaukonzentration von 0,153 mM/l die Bildung eines blauen Niederschlages auf. Wie aus der entsprechenden Ausfällungskurve der Abb. 5 ersichtlich ist, führte bereits der Zusatz von 0,19 mM/l d-TC zu 1,53 mM/l Anilinblau (Mol-Verhältnis 1:8) zur Ausfällung des Farbstoffes. Steigerung der Menge des d-TC-Zusatzes verursachte eine weitgehend lineare Zunahme der Farbstoffausfällung, die bei einem äquimolaren Zusatz von d-TC vollständig war. Die gleichen Ausfällungsverhältnisse konnten wir auch bei Verwendung 10fach höherer Konzentrationen an d-TC und Anilinblau beobachten.

Bei einem Vergleich der d-TC Ausfällungskurven des Anilinblaus und des Kongorots fällt vor allem der Unterschied im Kurvenlauf ins Auge. Dem weitgehend linearen Kurvenverlauf der Anilinblaukurve steht der S-förmige Verlauf der Kongorotkurve gegenüber. Es ist möglich, daß die verschiedene Form der beiden Ausfällungskurven auf einen Unterschied in der chemischen Natur der beiden Ausfällungsvorgänge hinweist, da der chemische Aufbau der beiden Farbstoffe grundverschieden ist. So kann bei der Ausfällung des Kongorots und des Germanins durch d-TC an eine Salzbildung der sauren Sulfosäurederivate bzw. an eine Entladung der negativ aufgeladenen Kolloidmicellen des Kongorots und Germanins durch Zusatz des basischen d-TC gedacht werden. Eine analoge Reaktionsweise des Triphenylmethanfarbstoffes Anilinblau mit d-TC ist jedoch wegen der basischen Natur des Farbstoffes ausgeschlossen.

Es besteht nun die Möglichkeit aus dem Verlauf der Ausfällungskurven einen Hinweis auf die Zusammensetzung der gefärbten Präzipitate bzw. der Anzahl der Reaktionsteilnehmer an der Ausflockungsreaktion zu erhalten. Hierzu sind folgende einfache mathematische Überlegungen notwendig: Bei Annahme einer monomolekularen Assoziationsreaktion eines Moleküls Farbstoff mit einem Molekül d-TC liegt folgendes Gleichgewicht vor:

$$K = \frac{F \cdot C}{(FC)\,l} \tag{1}$$

wobei F die jeweils vorherrschende Farbstoffkonzentration, C die entsprechende Konzentration an nicht ausgefälltem d-TC und K die Dissoziationskonstante der Reaktion bedeutet. $(FC)l$ ist die Konzentration des Farbstoff-d-TC Komplexes in Lösung. Infolge Vorliegen eines unlöslichen Bodenkörpers von (FC) kann die Konzentration an löslichem (FC) als konstant angenommen werden und Gleichung (1) vereinfacht sich zu:

$$K = F \cdot C \tag{1a}$$

Nun ist in den in Abb. 5 wiedergegebenen Versuchen $F = 0{,}153 - (FC)$ (2) und $C = Cg - (FC)$ (3) wobei Cg die ursprünglich bei Versuchsbeginn vorgegebene d-TC Konzentration (Abszissenwerte der Abb. 5) darstellt. Einsetzen von Gleichung (2) und (3) in (1a) ergibt:

$$K = F \cdot C = [0{,}153 - (FC)]\,[Cg - (FC)] \tag{1b}$$

daraus ergibt sich

$$Cg = \frac{K}{0{,}153 - (FC)} + (FC). \tag{1c}$$

In analoger Ableitung läßt sich für die Ausfällung eines Mol des Farbstoffes durch $\frac{1}{2}$ Mol d-TC die Gleichung

$$Cg = \frac{K^2}{[0{,}153 - FC/_2]^2} + \frac{FC/2}{2} \tag{4}$$

aufstellen. Da in den Ansätzen der beiden Gleichungen die molare Menge des ausgefällten Farbstoffes gleich der molaren Menge des gebildeten unlöslichen Komplexes Farbstoff-d-TC gesetzt wurde, geben die Ordinatenwerte der Abb. 5 die in beiden Gleichungen (1c und 4) verwendeten Werte (FC) bzw. $(FC/2)$ wieder. Unter der Annahme, daß die Dissoziationskonstanten der beiden Farbstoff-d-TC Komplexe sehr klein sind, können für kleinere d-TC Konzentrationen in Gleichung (1c) und (4) die Bruchausdrücke vernachlässigt werden und beide Gleichungen vereinfachen sich zu $Cg = (FC)$ (5) für die bimolekulare und $Cg = (FC/2)/2$(6) für die trimolekulare Reaktion. Eine solche Vereinfachung ist sicher gerechtfertigt, da die Tatsache der kompletten Ausfällung der Farbstoffe bei äquimolekularem Farbstoffzusatz eine hohe Stabilität und damit das Vorhandensein einer kleinen Dissoziationskonstante anzeigt. Von den beiden Gleichungen (5 und 6) entspricht nun Gleichung (6) weitgehend dem experimentell bestimmten Verlauf der Ausfällungskurve des Anilinblaus in Abb. 5, da letztere in dem Bereich kleinerer d-TC-Konzentrationen linear verläuft und nur bei höherer bereits an die Konzentration des Farbstoffes herankommenden d-TC-Konzentrationen assymptotisch in die komplette Ausfällung einläuft. Auch stimmt die experimentell gefundene Steigung der Geraden $FC/2/Cg = 1{'}9$ mit dem theoretischen Wert der Gleichung (6) von 2,0 gut überein. Daraus kann geschlossen werden, daß die Ausfällung des Anilinblaus durch Reaktion von zwei Molen des Farbstoffes mit einem Mol d-TC erfolgt und daß die Dissoziationskonstante dieser Reaktion einen sehr kleinen Wert besitzen muß. Der

S-förmige Verlauf der Ausfällungskurven des Kongorots kann durch die beiden oben gewonnenen Gleichungen nicht wiedergegeben werden. Möglicherweise hängt die Anzahl der mit Kongorot reagierenden d-TC-Moleküle von dem molaren Konzentrationsverhältnis der beiden Reaktionspartner ab, da in einem solchen Falle die Steigung der Kurve von der jeweiligen d-TC-Konzentration abhängig und damit ein linearer Kurvenverlauf unmöglich wird.

Diskussion.

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß neben d-Tubocurarin auch sogenannte depolarisierende Muskelrelaxantien durch Kongorot, Germanin, Anilinblau, Naphthionin und Sulfanilsäure antagonistisch beeinflußt werden. Auch die seinerzeit von Thienes beobachtete antagonistische Wirkung des Kongorot gegenüber der neuromuskulär lähmenden Wirkung von Tetramethylammonium kann hier als weiterer Beweis einer solchen Möglichkeit angeführt werden. Somit spielt die Art des Wirkungsmechanismus der Muskelrelaxantien keine wesentliche Rolle für die Antagonisierbarkeit einer neuromuskulär lähmenden Wirkung durch Kongorot und die übrigen untersuchten Verbindungen. Beide Typen von Muskelrelaxantien besitzen als gemeinsames chemisches Strukturmerkmal quartäre Ammoniumgruppen und es liegt nach den Kenslerschen Untersuchungen nahe, nun auch bei den depolarisierenden Muskelrelaxantien den Angriffspunkt der antagonistischen Kongorotwirkung bei den quartären Ammoniumgruppen zu suchen.

Die Tatsache, daß Kongorot Sulfonsäuregruppen enthält, hat Kensler dazu veranlaßt, anzunehmen, daß der Antagonismus auf einer salzartigen Bildung solcher Gruppen mit den quartären Stickstoffatomen des d-TC beruht. Tatsächlich fand er auch, daß in vitro Kongorot und Methylorange unlösliche Verbindungen mit d-TC eingehen. Allerdings konnte Kensler keinen absoluten Parallelismus zwischen der Fähigkeit unlösliche Salzkomplexe zu bilden, und der Eigenschaft die Wirkungen von d-TC aufzuheben, feststellen, da er selbst hervorhebt, daß Methylorange zwar fällend wirkt, jedoch nur einen sehr schwachen d-TC-Antagonismus in vivo zeigt. Niedermolekulare Sulfonsäureverbindungen zeigten bei Kensler weder die eine noch die andere Wirkung.

Die von uns verwendeten depolarisierenden muskellähmenden Stoffe lassen zunächst eine ähnliche Erklärung zu, da auch sie quartäre Ammoniumgruppen besitzen, die sie zu einer Salzbildung mit den Sulfosäuregruppen, wie sie z. B. auch in dem von uns als Antagonisten beschriebenen Germanin vorliegen, befähigen. Tatsächlich konnten wir auch für Kongorot in vitro die Bildung unlöslicher Präcipitate mit Dekamethonium und BC 16 nachweisen. Mit Germanin war dies allerdings nur gegenüber d-TC möglich, wobei in Erwägung gezogen werden muß, daß die entsprechenden Salzverbindungen mit Dekamethonium und BC 16 zwar

ebenfalls eintreten könnten, jedoch durch bessere Wasserlöslichkeit am Ausfällen verhindert werden. Dies ist offenbar auch bei der Verbindung zwischen BC 16 und Kongorot der Fall, so daß es nicht gelang mit BC 16 auch bei großem Überschuß eine komplette Ausfällung des Kongorotes zu erreichen. Die Unlöslichkeit derartiger Salzbildungen ist offenbar nicht allein ausschlaggebend für die antagonistische Wirkung gegenüber der lähmenden Wirkung quartärer Ammoniumbasen, da z. B. Germanin deutlichen Antagonismus gegen BC 16 und schwächer auch gegen Dekamethonium zeigte. Das ist um so mehr hervorzuheben, als in unseren Versuchen im Gegensatz zu Kenslers Ergebnissen auch kleinmolekulare Verbindungen mit Sulfonsäuregruppen (Naphthionin, Sulfanilsäure) deutliche, wenn auch schwächere antagonistische Wirkung sowohl gegenüber d-TC als auch gegenüber den depolarisierenden muskellähmenden Stoffen zeigten, obwohl weder Kensler noch wir mit solchen Stoffen eine Präcipitatbildung mit quartären Ammoniumbasen nachweisen konnten.

Es erscheint nunmehr aber überhaupt fraglich, ob die Sulfosäuregruppen der Antagonisten ausschließlich für diese Wirkung verantwortlich gemacht werden können. Dies geht daraus hervor, daß Anilinblau, welches Petroff als erster in seiner antagonistischen Wirkung gegenüber Curare erkannt hat, auch in unseren Versuchen sowohl gegen d-TC als auch gegen Dekamethonium und BC 16 antagonistisch wirkt. Dieser Farbstoff enthält jedoch überhaupt keine Sulfonsäuregruppen, vielmehr ist er seiner chemischen Natur nach selbst als Base aufzufassen. Interessanterweise konnten wir jedoch in vitro auch mit Anilinblau Fällungen durch d-TC im gleichen Konzentrationsbereich wie bei Kongorot feststellen. Sowohl mit Dekamethonium als auch mit BC 16, gegenüber denen es auch antagonistisch wirksam war, trat jedoch keine Fällung auf. Ergänzend mag hier auch noch angeführt werden, daß wir in Versuchen mit einem Chitosanpolyschwefelsäureester, den wir Herrn Doz. Dr. E. Deutsch von der ersten med. Univ.-Klinik verdanken, keinerlei antagonistische Wirkungen gegenüber d-TC erhalten konnten.

Alle diese Tatsachen sprechen dafür, daß zum mindesten neben dem Vorhandensein von stark negativen Gruppen auch die Molekülgröße und das Vorhandensein von aromatischen Ringen und aromatisch substituierten Aminogruppen für das Auftreten von antagonistischen Wirkungen gegenüber muskellähmenden quartären Ammoniumbasen wichtig sind. Daß prinzipiell Verbindungen von Stoffen, die keine stark negativen Ladungen tragen, mit d-TC möglich sind, wurde oben für Anilinblau bewiesen. Es ist wahrscheinlich, daß die van der Waalschen Kräfte solcher aromatischer Ringsysteme für die Affinität sowohl zu Strukturen der Endplatte, wie auch zu den Molekülen der Muskelrelaxantien maßgeblich sind. Die Unwirksamkeit aliphatischer Polyschwefelsäureverbindungen, deren ionisierte Säuregruppen stärker durch

Hydrathüllen abgeschirmt sind, scheint die Bedeutung aromatischer Ringsysteme für die antagonistische Wirkung an der Endplatte weiter zu unterstreichen.

Zusammenfassung.

1. Die Versuche von Petroff und Kensler über einen Antagonismus zwischen Kongorot und Curare wurden an Warmblüterpräparaten bestätigt. Darüber hinaus konnten wir zeigen, daß auch die neuromuskuläre Lähmung von „depolarisierenden Substanzen" wie Dekamethonium und Hexamethylen-bis-carbaminoylcholin durch Kongorot abgekürzt bzw. aufgehoben wird.

2. Neben Kongorot zeigten auch Germanin (Bayer 205), Anilinblau, sowie Verbindungen von geringerer Molekülgröße wie Naphthylaminsulfonat und sulfanilsaures Natrium die Eigenschaft, neuromuskuläre Lähmungen sowohl vom Curare- als auch vom Depolarisationstypus zu antagonisieren.

3. Am Froschrectus wurde die durch BC 16 ausgelöste Kontraktur nach kleinen Dosen Kongorot und Anilinblau verstärkt, nach größeren Dosen gehemmt.

4. In Fällungsversuchen in vitro konnte gezeigt werden, daß Kongorot auch mit Dekamethonium und Hexamethylen-bis-carbaminoylcholin im gleichen Konzentrationsbereich wie mit d-TC unlösliche rotgefärbte Niederschläge bildet. Germanin und Anilinblau zeigten nur bei Zusatz von d-TC Niederschlagsbildung, während mit Hexamethylen-bis-carbaminoylcholin kein Niederschlag auftrat. Naphthionin und Sulfanilsäure zeigten weder mit d-TC noch mit den beiden genannten depolarisierenden Muskelrelaxantien eine Niederschlagsbildung.

5. Die Bedeutung negativer SO_3H-Gruppen sowie NH_2-Gruppen an aromatischen Kernen im Molekülverband für das Auftreten einer antagonistischen Wirkung gegenüber muskellähmenden quartären Stickstoffbasen wird diskutiert.

Literatur.

Bülbring, E.: Brit. J. Pharmacol. **1**, 38 (1946). — Chang, H., and J. H. Gaddum: J. of Physiol. **79**, 255 (1933). — Cheymol, J., R. Delaby, H. Nyjer et Y. Gay: C. r. Acad. Sci. (Paris) **235**, 1711 (1952). — Kensler, C. J.: J. of Pharmacol. **95**, 28 (1949). — Klupp, H., O. Kraupp, H. Stormann, Ch. Stumpf, N. Honetz and W. Kobinger: Arch. internat. Pharmacodynamie **96**, 161 (1953). — Petroff, J. R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **103**, 196 (1924); **106**, 214 (1925). — Taugner, R., u. A. Fleckenstein: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 286 (1950). — Thienes, C. H.: Arch. internat. Pharmacodynamie **39**, 314 (1930).

Professor Dr. F. Brücke, Wien/Österreich, Pharmakol. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 137—144 (1955).

Aus der I. Universitäts-Frauenklinik Wien
(Vorstand: Prof. Dr. T. Antoine).

Zur in Vivo-Inaktivierung von Testosteron bei der Ratte.

(Untersuchungen im Fructosetest.)

Von

W. Schneider und H. Rauscher.

(Eingegangen am 16. August 1954.)

Seit Zondek[21, 22] als erster die Aufmerksamkeit auf die Rolle der Leber im Steroidstoffwechsel gelenkt hat, hat sich das Hauptinteresse auf die Frage konzentriert, welche Wirkungseinbuße die Oe*strogene* in der Leber erfahren. Mit Fragen, die auf den Verlust der biologischen Wirksamkeit von Testosteron bei der Leberpassage Bezug nehmen, haben sich hingegen viel weniger Untersucher befaßt. Unter ihnen haben Biskind u. Mark[2] festgestellt, daß die — nach parenteraler Applikation männlichen Hormons immer auftretende — Zunahme des Prostatagewichts kastrierter Ratten ausbleibt, wenn Testosteron vor Erreichen des großen Kreislaufs den Pfortaderkreislauf passieren muß. Sie schlossen aus ihren Untersuchungen, daß sich die Stoffwechselvorgänge, die für den von ihnen beobachteten Wirkungsverlust als verantwortlich anzusehen sind, *innerhalb* der Leber abspielen dürften. Über analoge Ergebnisse wird von Burill u. Greene[3] bezüglich der Zerstörung des *endogenen* männlichen Hormons berichtet. Das Hormon aus dem Hoden blieb nämlich nach Ableitung in den Pfortaderkreislauf ebenfalls ohne Einfluß auf das Prostatagewicht. Die Fähigkeit von Methyltestosteron, das Gewicht der akzessorischen Geschlechtsdrüsen zu erhöhen, geht hingegen nach den gleichen Autoren durch die Leberpassage nicht vollkommen verloren.

Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, daß eine entsprechende Schädigung der Leber eine Verminderung ihres Inaktivierungsvermögens gegenüber Oestrogenen nach sich ziehen kann. Als wirksame Noxen haben sich unter anderem Tetrachlorkohlenstoff[15], Unterernährung[7], und zwar besonders Eiweißmangel[8] —, sowie Vitamin B-Komplexmangeldiät erwiesen. Von Biskind u. Biskind[1] wurde überraschenderweise gefunden, daß die gleiche Vitamin B-Mangeldiät, die das Inaktivierungsvermögen der Leber gegenüber Oestrogenen herabsetzte, ihre Fähigkeit zur Zerstörung von Testosteron unbeeinflußt ließ. In die gleiche Richtung weisen Ergebnisse von Grayhack u. Scott[5] aus der jüngsten Zeit, die zur Leberschädigung Tetrachlorkohlenstoff verwendeten. Bei ihren Versuchstieren waren auf Grund der histologischen Befunde rund 50% des Leberparenchyms als schwerst geschädigt anzusehen. Trotzdem erwies sich bei den Tieren mit geschädigter Leber das in den Pfortaderkreislauf abgeleitete Testosteron in bezug auf das Prostatagewicht als ebenso unwirksam wie bei den Kontrollen mit intakter Leber. Diese Ergebnisse schienen dafür zu sprechen, daß der Mechanismus, nach dem der Abbau

in der Leber erfolgt, für Oestrogene und Androgene verschieden sein muß. In einem gewissen Gegensatz zu dieser Auffassung steht das Resultat von Untersuchungen, die von Samuels[17] in vitro durchgeführt wurden. Er fand nämlich, daß sowohl totaler Nahrungsentzug durch 48 Std wie auch Niacin-Tryptophanmangeldiät die Fähigkeit der Leber Androgene zu zerstören, merklich herabzusetzen vermochte.

In den bisher zitierten Untersuchungen über die Inaktivierung von Testosteron durch die Rattenleber in vivo wurde der Effekt ausschließlich am *Gewicht* der Prostata bzw. der Bläschendrüse geprüft. Die Schwierigkeiten und Zweifel bei der Beurteilung von Ergebnissen, die sich nur auf gewichtsmäßige Veränderungen stützen können, wirken sich auf die Zuverlässigkeit der Interpretation vor allem bei solchen Untersuchungen aus, bei denen es sich darum handelt, *geringe* androgene Effekte nachzuweisen.

Seit einiger Zeit steht zur Kontrolle androkinetischer Wirkungen ein Verfahren zur Verfügung, das gegenüber den schon lange geübten Methoden der gewichtsmäßigen und histologischen Untersuchung gewisse Vorteile zu bieten scheint. Ausgangspunkt seiner Entwicklung war die Feststellung, daß die Bildung des in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen vieler Tierarten vorhandenen Zuckers — der von Mann[10] als Fructose identifiziert wurde — in engster Abhängigkeit von der Hodenhormonproduktion erfolgt.

Die ersten Untersuchungen, die am Kaninchen[11] durchgeführt wurden, ergaben, daß nach der Kastration die Fructose aus dem Samenplasma verschwindet, nach Zufuhr von männlichem Hormon aber prompt wieder erscheint. Bei der kastrierten Ratte fanden Mann u. Parsons[12] sogar eine *direkte* quantitative Beziehung zwischen der verabreichten Hormonmenge und der Höhe des Fructosegehaltes der Prostata. In weiteren Untersuchungen (Mann, Davies u. Humphrey[13], Lutwak, Mann, Mann u. Price[9]) wurde dann jenes Verfahren ausgearbeitet, das seither als Fructosetest bezeichnet wird. Es stellt nach Mann u. Parsons eine sehr empfindliche und relativ einfach durchzuführende Methode dar, die den Effekt von Stoffen mit androkinetischer Wirkung nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ zu erfassen erlaubt.

Gegenüber der histologischen Untersuchung konnte die Überlegenheit des Fructosetests besonders eindrucksvoll bei Untersuchungen an Stierkälbern[13] demonstriert werden. Für die Verhältnisse bei der Ratte ergab sich aus eigenen Untersuchungen[16] u. a. der Schluß, daß — bei Verwendung der akzessorischen Geschlechtsdrüsen als Reaktionsterrain — das Vermissen histologisch nachweisbarer Veränderungen an der Bläschendrüse nicht genügt, um die Existenz androgener Impulse auszuschließen, wie sie am Fructosegehalt der Prostata erfaßt werden können. Infolge seiner hohen Empfindlichkeit kann der Fructosetest als ein Verfahren für den Nachweis schwacher und schwächster androgener Effekte angesehen werden. Umgekehrt dürfte seine Anwendung ebenso bei allen Fragestellungen zweckmäßig sein, bei denen es sich darum

handelt, androkinetische Wirkungen mit größtmöglicher Sicherheit *auszuschließen*. Vor allem unter dem Gesichtspunkt dieser zweiten Möglichkeit schien es von Interesse, die Wirkungseinbuße des Testosterons beim Durchgang durch die Leber im Fructosetest zu prüfen. Zum Zwecke des Vergleichs wurden in den vorliegenden Untersuchungen gleichzeitig auch das Gewicht von Prostata und Bläschendrüse ermittelt und letztere auch histologisch untersucht. Auf den histologischen Befund der Prostata mußte verzichtet werden, da zur Fructosebestimmung das Organ in toto verarbeitet wurde.

Zur Durchführung des Fructosetests können 2 Wege beschritten werden. Zu Untersuchungen an Tieren, bei denen das Ejakulat — beispielsweise mit Hilfe einer künstlichen Vagina — ohne größere Schwierigkeiten zu gewinnen ist, kann die Bestimmung der Fructose im *Samenplasma* erfolgen. Mit diesem Weg ist der Vorteil verbunden, daß die Tiere nicht geopfert zu werden brauchen. Der zweite Weg, der u. a. auch bei der Ratte gewählt werden muß, besteht in der Ermittlung des Fructosegehalts der *akzessorischen Geschlechtsdrüsen*, die zu diesem Zweck unmittelbar nach der Tötung der Tiere entnommen werden.

Die Produktionsstätte der Fructose variiert bei den verschiedenen Tierarten. Bei der Ratte wird sie nach Humphrey u. Mann[6] hauptsächlich in der sogenannten coagulating gland, ferner im dorsalen und in den dorsolateralen Anteilen der Prostata gefunden. Der ventrale Anteil sowie die Bläschendrüsen sind fructosefrei. Die androgene Wirkung kann entweder im Erhaltungstest oder im Regenerationstest geprüft werden. Wir haben an anderer Stelle[16] ausführlich auseinandergesetzt, daß unserer Auffassung nach für den Nachweis *schwacher* androgener Effekte nur der Regenerationstest als zweckmäßig anzusehen ist. Bei der gleichen Gelegenheit wurde auch zur Frage des Tiermaterials Stellung genommen, das verwendet werden muß, um auch geringste Fructosewerte als sicher exogen bedingt ansprechen zu dürfen.

Material und Methodik.

45 männliche Ratten des Glaxostammes im Gewicht von nicht über 35 g wurden am 28. Lebenstag kastriert und 60 Tage nachher in 3 gleiche Gruppen eingeteilt. Gruppe I erhielt Testosteronpropionat unter die Rückenhaut, Gruppe II in die Milz implantiert. Gruppe III diente als unbehandelte Kontrolle. Testosteronpropionat* kam in Form von Stäbchen zu 25 mg zur Verwendung. Jedes der behandelten Tiere aus Gruppe I und II erhielt 1 Stäbchen. Nach der Einpflanzung in die Milz wurde die Implantationsstelle mit Netz gedeckt und dieses an der hinteren Magenwand fixiert. Die Tiere befanden sich vom Zeitpunkt der Kastration an unter gleichen Ernährungs- und Umweltsbedingungen.

24 Tage nach der Implantation wurden alle Tiere mittels Äther getötet. Bei den mit Testosteronpropionat behandelten Tieren wurde der Rest der Stäbchen rückgewogen.

Die Prostata wurde sorgfältig abpräpariert und von eingelagertem Fettgewebe befreit. Die Wägung erfolgte in frischem Zustand auf der Torsionswaage. Nach der chemischen Verarbeitung wurde die Fructose photometrisch bestimmt (Einzelheiten bei Rauscher u. Schneider).

* Für die Überlassung der benötigten Versuchsmengen sei an dieser Stelle dem wissenschaftlichen Leiter des chemischen Laboratoriums der SANABO, Wien, Herrn Dr. Kerschbaum, unser Dank ausgesprochen.

Von den Bläschendrüsen wurden nach Ermittlung ihres Gewichts und dem üblichen histologischen Arbeitsgang Paraffinschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Bei der Autopsie jener Tiere, denen Testosteronpropionat in die Milz implantiert worden war, wurde die Implantationsstelle besonders vorsichtig freigelegt und sorgfältig darauf geachtet, ob Adhäsionen bestanden. Die Befunde bei Tieren mit Adhäsionen, und zwar auch solchen, in denen makroskopisch keine Gefäße zu erkennen waren, wurden für die Gegenüberstellung mit den Resultaten nach subcutaner Implantation ausgeschieden; sie werden kurz anhangsweise besprochen.

Ergebnisse.

Das Gewicht der Stäbchenreste, die nach 24tägiger Versuchsdauer rückgewonnen wurden, bewegte sich bei Gruppe I und II innerhalb derselben Größenordnung und betrug zwischen 3 und 9 mg.

In Gruppe II (intralienale Applikation) konnten bei Anlegung schärfster Maßstäbe bezüglich der Adhäsionsbildung nur 9 von 15 Tieren für die Bewertung herangezogen werden.

Die Werte für die Fructose in γ/Organ sowie für das Gewicht von Prostata und Bläschendrüsen in Gruppe I und III und bei den für den Vergleich verwendbaren Tieren von Gruppe II sind in der Tabelle wiedergegeben.

Tabelle 1.

Gruppe	Zahl der Tiere	Fructose in γ/Organ (S. E.)	Prostatagewicht (S. E.)	Bläschendrüsengew. (S. E.)
I	15	381,0 $\pm$ 6,38	946,0 $\pm$ 30,5	1573,0 $\pm$ 59,2
II	9	0	8,3 $\pm$ 0,44	8,8 $\pm$ 0,75
III	15	0	7,8 $\pm$ 0,46	7,0 $\pm$ 0,38

Histologisch boten die Bläschendrüsen in Gruppe I das Bild, das nach den von Moore, Hughes u. Gallagher[14] aufgestellten Kriterien als typisch für die vollfunktionierende Drüse anzusehen ist. Die Epithelzellen waren hochzylindrisch, die hellen Kerne ließen keinerlei Schrumpfungsvorgänge erkennen und waren ihrem Aussehen nach als aktiv anzusprechen. In jeder Drüse waren reichlich Sekretgranula zu finden, die Lumina waren erfüllt von eosinophil gefärbtem Sekret. In Gruppe II war bei den Tieren *ohne* Adhäsionen jeweils folgender Befund zu erheben: die Epithelzellen waren flach kubisch, so daß der dunkle Kern, dessen Chromatin deutlich verklumpt war, die ganze Zellhöhe ausfüllte. Sekret war weder in den Drüsenlumina noch in den großen Hohlräumen zu sehen. Das Bild entsprach in jeder Beziehung dem histologischen Befund beim Kastraten. Derselbe Befund war in Gruppe III (unbehandelte Kontrollen) festzustellen.

Bei den Tieren mit intralienaler Applikation von Testosteronpropionat, die bereits makroskopisch erkennbare Gefäße in den Adhäsionen aufwiesen, wurden Fructosewerte zwischen 46 und 161 γ/Organ

gefunden. In Analogie dazu zeigten die Bläschendrüsen verschieden starke sekretorische Aktivität.

Ein Tier wies einen Adhäsionsstrang auf, in dem makroskopisch *keine* Gefäße zu erkennen waren. Der Fructosegehalt seiner Prostata wurde mit 6 γ ermittelt. Gewicht von Prostata und Bläschendrüsen wiesen gegenüber den Milzandrogentieren *ohne* Adhäsionen keinen verwertbaren Unterschied auf. Das Epithel der Bläschendrüsen war atrophisch wie beim Kastraten.

Diskussion.

Bei den Tieren, die Testosteron erhalten hatten, kamen im Laufe der 24tägigen Versuchsdauer, unabhängig von der Implantationsstelle, Mengen von 16—22 mg zur Resorption. Sie wurden dem Organismus in Form eines kontinuierlichen Hormonstroms angeboten. Bei dauernder Zufuhr kann unter gewissen Voraussetzungen eine weitaus günstigere Verwertung erfolgen als bei fraktionierter Applikation. Daraus erklären sich die relativ hohen Fructosewerte, die bei den Tieren mit subcutaner Implantation von Testosteronpropionat gefunden wurden. Sie versinnbildlichen einen starken androgenen Effekt, der in seinem Umfange allerdings erst bei Vergleichen mit den Fructosewerten von normalen geschlechtsreifen Tieren richtig beurteilt werden kann. In einer früheren Untersuchung[16] hatten wir bei geschlechtsreifen Tieren im Gewicht zwischen 175 und 225 g maximale Fructosewerte von 131—230 γ/Organ ermittelt. In der vorliegenden Untersuchung war das Gewicht der Tiere bei Versuchsende weitaus geringer und betrug nur 115—135 g; die Werte für die Fructose beliefen sich aber auf minimal 350 und maximal 410 γ/Organ. Durch die histologische Untersuchung der Bläschendrüsen wäre dieser starke androgene Effekt nicht so deutlich zum Ausdruck gekommen. Denn der histologische Befund der Bläschendrüsen nach subcutaner Implantation von Testosteronpropionat zeigte gegenüber dem Bild des vollfunktionierenden Epithels, das wir seinerzeit bei den geschlechtsreifen Tieren am Tage der Kastration erhoben hatten, keinen Unterschied.

Die Resorptionsquote lag nach subcutaner und intralienaler Implantation innerhalb derselben Grenzen. Im Hinblick auf den sehr starken androgenen Effekt nach subcutaner Implantation ist der negative Fructosebefund nach Implantation in die Milz besonders bemerkenswert. Er läßt darauf schließen, daß bei der Leberpassage Testosteronmengen inaktiviert werden können, die beträchtlich über das als physiologisch anzusehende Angebot hinausgehen dürften.

Besondere Beachtung verdient ferner der Befund, den wir bei dem Tier ermittelt haben, das *keine* sichtbaren Gefäße in dem Adhäsionsstrang aufwies. Bei den Milzandrogentieren *ohne* Adhäsionen war in

keinem Fall Fructose nachzuweisen. Wir schließen deshalb, daß die 6 γ Fructose bei dem Tier mit dem Adhäsionsstrang — auch wenn makroskopisch keine Gefäße zu erkennen waren — dadurch zustandegekommen sind, daß geringste Mengen aus dem Milzimplantat *ohne* vorher die Leber passiert zu haben, in den großen Kreislauf gelangt sind.

Gewicht von Prostata und Bläschendrüsen dieses Tieres zeigten gegenüber den milzimplantierten Tieren *ohne* Adhäsionen keine verwertbare Zunahme, der histologische Befund der Bläschendrüse entsprach dem Bild beim Kastraten. Damit stellen die Befunde bei diesem Tier erstens eine weitere Stütze für die Auffassung dar, daß zum Erfassen *schwacher* androgener Effekte der Fructosetest geeigneter zu sein scheint als die übliche histologische oder gewichtsmäßige Untersuchung an den akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Zweitens bestärken sie den Schluß, der aus den Ergebnissen bei jenen Tieren abzuleiten ist, bei denen nach der Milzimplantation *keine* Adhäsionen auftraten.

Bei diesen Tieren ohne Adhäsionen darf als sicher angenommen werden, daß das gesamte in der Milz zur Resorption gelangte Testosteronpropionat in das Einzugsgebiet der Pfortader und somit in die Leber abgeleitet wurde. Bei dem Tier *ohne* Gefäße im Adhäsionsstrang hat sich gezeigt, daß selbst so minimale androgene Effekte wie sie 6 γ Fructose entsprechen, im chemischen Test nachweisbar werden. Darum bestärkt uns die Tatsache, daß nach Milzimplantation *ohne* Adhäsionsbildung die Prostata ausnahmslos fructose*frei* gefunden wurde, in der Folgerung, daß nach Ableitung in den Pfortaderkreislauf die Fähigkeit des Testosteronpropionats, androgene Effekte hervorzurufen, *vollkommen* verloren geht.

Unsere Ergebnisse im Fructosetest weisen in die gleiche Richtung wie die Resultate jener Untersuchungen, bei denen nach Implantation von Testosteron in die Milz das Gewicht der Prostata unbeeinflußt blieb. Ob das Ausbleiben peripherer Effekte nach Einbringen von Testosteronpropionat in den Pfortaderkreislauf zur *Gänze* auf Stoffwechselvorgänge zurückzuführen ist, die sich innerhalb der Leber abspielen, scheint damit allerdings noch nicht entschieden. Für die Oestrogene darf seit den Untersuchungen von Tschopp[19, 20], die an Meerschweinchen durchgeführt wurden, angenommen werden, daß nach dem Durchgang durch die Leber aktive Metaboliten in der Galle aufscheinen. Bei Ratten[18] hat der eine von uns (W. Schneider) 10 mg Hexöstrol in die Milz appliziert. Die während der darauffolgenden 6 Std gewonnene Galle wurde kastrierten Weibchen verabreicht und führte bei ihnen zum Auftreten von Schollen im Abstrich. Daraus ist zu entnehmen, daß die Oestrogene zumindest beim ersten Durchgang durch die Leber noch keinen vollständigen Wirkungsverlust erfahren. Das Ausbleiben peripherer Effekte trotz Anwesenheit biologisch aktiver Stoffe in der Galle läßt nur

die Deutung zu, daß die aktiven Metaboliten entweder mit den Faeces ausgeschieden oder aber aus dem Darm rückresorbiert werden und so neuerdings in die Leber gelangen. Wie weit diese letztere Möglichkeit auch für den Stoffwechsel des männlichen Hormons ins Auge gefaßt werden muß, steht noch offen.

In diesem Zusammenhang muß an die anfangs erwähnten Untersuchungen von SAMUELS erinnert werden, die dafür zu sprechen scheinen, daß in vitro Testosteronpropionat von der geschädigten Leber *nicht* vollkommen zerstört wird. GRAYHACK u. SCOTT konnten andererseits in vivo, ebenfalls bei geschädigter Leber, an der *Peripherie* keinen Effekt feststellen. Der Frage, ob dasselbe Verhalten bezüglich der Inaktivierung in vivo und in vitro auch bei nicht geschädigter Leber nachzuweisen ist, wurde unseres Wissens bisher noch nicht nachgegangen. Sie wird zur Zeit bei uns untersucht. Auf Grund der heute mitgeteilten Ergebnisse kann vorerst lediglich gesagt werden, daß nach Eintritt von Testosteronpropionat in die intakte Rattenleber Vorgänge erfolgen müssen, die mit augenscheinlicher Sicherheit verhindern, daß aktive Abbauprodukte den großen Kreislauf erreichen. Besonderen Nachdruck gewinnt diese Schlußfolgerung im Hinblick darauf, daß sie auf Untersuchungen mit einer Methode basiert, die sich durch eine besonders hohe Empfindlichkeit auszeichnet.

Zusammenfassung.

In vorausgehenden eigenen Untersuchungen hat sich der Fructosetest an der Ratte als besonders empfindliches Verfahren zum Nachweis androgener Effekte erwiesen. Für das Erfassen minimaler androkinetischer Wirkungen scheint er den älteren Methoden der gewichtsmäßigen und histologischen Untersuchung überlegen zu sein. In der vorliegenden Untersuchung wurde bei kastrierten Rattenmännchen der Fructosegehalt der Prostata nach subcutaner und intralienaler Implantation von Testosteronpropionat geprüft. Nach intralienaler Applikation wurde — sofern keine Adhäsionsbildung erfolgte — die Prostata ausnahmslos fructosefrei gefunden. Im Hinblick auf die hohe Empfindlichkeit des verwendeten Tests wird geschlossen, daß nach Einbringen von Testosteronpropionat in den Pfortaderkreislauf nicht einmal geringste Menge aktiver Metaboliten in den großen Kreislauf gelangen können.

Literatur.

[1] BISKIND, M. S., and G. R. BISKIND: Endocrinology (Springfield, Ill.) **32**, 97 (1943). — [2] BISKIND, G. R., and J. MARK: Bull. Johns Hopkins Hosp. **65**, 212 (1939). — [3] BURILL, M. W., and E. R. GREENE: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **44**, 273 (1940). — [4] BURILL, M. W., and E. R. GREENE: Endocrinology (Springfield, Ill.) **31**, 73 (1942). — [5] GRAYHACK, J. T., and M. W. SCOTT: Endocrinology (Springfield, Ill.) **48**, 453 (1951). — [6] HUMPHREY, G. F., and T. MANN: Nature

(Lond.) **161**, 352 (1948). — [7] Jailer, J. W.: Endocrinology (Springfield, Ill.) **43**, 78 (1948). — [8] Jailer, J. W.: J. Clin. Endocrin. **9**, 675 (1949). — [9] Lutwak-Mann, C., T. Mann and D. Price: Proc. Roy. Soc. Med. **136**, 461 (1949). — [10] Mann, T.: Nature (Lond.) **156**, 80 (1945). — [11] Mann, T., and U. Parsons: Nature (Lond.) **160**, 294 (1947). — [12] Mann, T., and U. Parsons: Biochemic. J. **46**, 440 (1950). — [13] Mann, T., D. V. Davies and G. F. Humphrey: Endocrinology (Springfield, Ill.) **6**, 75 (1949). — [14] Moore, C. R., W. Hughes and F. Gallagher: Amer. J. Anat. **45**, 109 (1930). — [15] Pincus, G., u. D. W. Martin: Endocrinology (Springfield, Ill.) **27**, 65 (1949). — [16] Rauscher, H., u. W. Schneider: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 447 (1954). — [17] Samuels, L. T.: Recent Progr. in Hormone Res. **4**, 65 (1949). — [18] Schneider, W.: unpublizierte Daten. — [19] Tschopp, E.: Helvet. physiol. Acta **4**, 401 (1946). — [20] Tschopp, E.: Helvet. physiol. Acta **5**, 406 (1947). — [21] Zondek, B.: Lancet **1934**, II, 356. — [22] Zondek, B.: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **70**, 132 (1934).

Dr. W. Schneider, Wien/Österreich, I. Univ.-Frauenklinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 145—148 (1955).

Aus der Chirurgischen Universitäts-Klinik Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. H. Hellner).

Affinität von Thiosemicarbazonderivaten und deren Spaltprodukten zur Nebenniere.

Von
H. Poppe, H. Weidemann, K. Hinrichs und H. Steyer.

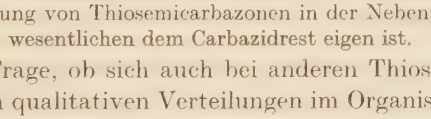
Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. August 1954.)

Während auf Grund der ersten experimentellen Untersuchungen von Domagk[2] der Anwendung von Thiosemicarbazonen bei der Tuberkulose in zahlreichen experimentellen Untersuchungen Aufmerksamkeit geschenkt wurde, wendet sich das allgemeine Interesse in den letzten Jahren immer mehr den Wirkungen auf das endokrine System, insbesondere auf die Nebenniere, zu. Heilmeyer u. Mitarb.[3, 4] gebührt das Verdienst, bereits 1950 auf bemerkenswerte Analogien in Wirkungsweise und Mechanismus zwischen einem Vertreter der Thiosemicarbazone, dem Conteben (4-Äthylamino-benzaldehydthiosemicarbazon) und ACTH sowie Cortison hingewiesen zu haben.

Eine Reihe klinischer Beobachtungen hat die damals ausgesprochene Vermutung nur bekräftigen können. So wird in den letzten Jahren einer Behandlung mit Conteben bei völlig anderen Affektionen als der Tuberkulose, z. B. bei Psoriasis, chronischen Gelenkrheumatitiden, beim nephrotischen Syndrom des Kindes und beim kardialen Ödem des Erwachsenen immer nachdrücklicher das Wort geredet[8, 10, 9, 1]. In eigenen experimentellen Untersuchungen mit einem radioaktiv etikettierten Contebenmolekül sowie mit einem möglichen Abbauprodukt des Contebens im Organismus, dem Thiosemicarbazid, konnten die Vermutungen bewiesen werden, die von einer direkten Einwirkung dieser Pharmaka auf die Nebenniere selbst sprechen[5, 6, 7]. Besonders die Versuche mit Thiosemicarbazid[7] konnten zeigen, daß die Speicherung von Thiosemicarbazonen in der Nebenniere sowie die Wirkung auf dieselbe im wesentlichen dem Carbazidrest eigen ist.

Es war nun die Frage, ob sich auch bei anderen Thiosemicarbazonderivaten die gleichen qualitativen Verteilungen im Organismus ergeben. Die Ausscheidungsverhältnisse, besonders durch die Schleimhäute des Körpers, waren z. B. bei Conteben und einem anderen Thiosemicarbazon, dem 4-Äthylsulfon-benzaldehyd-thiosemicarbazon (Polyteben)



völlig gleich[11]. Es ist inzwischen bekannt, daß der gute therapeutische Effekt des Conteben auf die Tuberkulose der Wirksamkeit des unversehrten Moleküls zuzuschreiben ist, während sich bei der Anwendung

dieses Stoffes bei der Psoriasis oder beim Gelenkrheumatismus eine ganz andere Wirkungskomponente in den Vordergrund schiebt. Die Speicherung von wesentlichen Teilen des Contebenmoleküls bzw. von Thiosemicarbazid in der Nebenniere war zu auffällig! Konnte schon bei den Versuchen mit Thiosemicarbazid geklärt werden, daß eine Aufspaltung erfolgte, *so war es wünschenswert zu klären, wie die relative Verteilung der Spaltprodukte im Organismus ist und welches hinsichtlich der Nebennierenspeicherung der wesentliche Molekülanteil ist.* Diese Möglichkeit bot das 4-Äthylsulfon-benzaldehyd.

Diese Substanz erlaubt auf Grund der Tatsache, daß sie 2 Schwefelatome im Molekülverband besitzt, entweder die Sulfon- oder die Carbazongruppe durch radioaktive Schwefelatome (S^{35}) zu etikettieren. Bei getrennter Verabfolgung von Polyteben I oder Polyteben II

(Polyteben I = radioaktives Schwefelatom in der Sulfongruppe
Polyteben II = radioaktives Schwefelatom in der Carbazongruppe)*

beweisen verschiedene Aktivitäten in einem Organ, daß eine Aufspaltung des Moleküls erfolgt ist; gleichzeitig ist die Größe der Differenz der Aktivität bei Anwendung unseres empfindlichen radioaktiven Nachweisverfahrens[8] ein Maß für die relative Verteilung der Spaltprodukte in den Organen.

Wir haben an 12 Ratten und 60 Meerschweinchen Serienversuche nach intraperitonealer, intrapleuraler und oraler Applikation von Polyteben I und Polyteben II durchgeführt. Die Verabfolgung geschah in einer Aufschwemmung mit physiologischer Kochsalzlösung in täglichen Mengen von 50 mg Polyteben. Bei der oralen Applikation wurde eine Schlundsonde verwandt. Von allen Tieren wurden in verschiedener Zeit nach der Applikation folgende Organe verascht und deren Aktivitätsgrad bestimmt:

Hirn, Lunge, Herz, Milz, Leber, Nebennieren, Gallenblase, Magen, Dünndarm, Blinddarm, Dickdarm, Nieren.

Bei den Ausscheidungsorganen geschah die Verarbeitung nach sorgfältiger Präparation und Reinigung. Die Ausscheidungen selbst wurden jeweils für ein Organ oder einen Organabschnitt getrennt verarbeitet (z. B. Magen-, Dünndarm- oder Dickdarminhalt pro Tag).

Es wurde sowohl die spezifische Aktivität je Gramm Organ als auch die Aktivität je Gesamtorgan und das mg-Äquivalent-Polyteben ermittelt. Wir haben in früheren Mitteilungen über diese Arbeitsweise bereits ausführlich berichtet[5,6,7,11].

Insgesamt wurden auf diese Weise pro Tier 24 getrennte Organe oder Organinhalte untersucht. Wir glauben, daß auf Grund dieser 1730 Organbestimmungen der individuelle Streufaktor relativ klein gehalten werden konnte. Die mittlere Streuung aller Untersuchungen beläuft sich auf $\pm$ 5,4%.

Die Mittelwerte aus den Bestimmungen der Organe bzw. Organinhalte sind in dem Diagramm (Abb. 1) dargestellt:

* Die Präparate wurden uns in dankenswerter Weise von den „Bayer-Werken" (Wuppertal-Elberfeld) zur Verfügung gestellt.

Die in dem Diagramm zusammengefaßten Ergebnisse lassen folgende Schlüsse zu:

1. In allen Organen mit Ausnahme von Milz und Niere sind Polyteben I und Polyteben II in verschiedener Konzentration vorhanden.

Es muß also eine Aufspaltung im Organismus erfolgt sein.

Abb. 1. Mittelwerte aus 1440 Organbestimmungen.
Polyteben I. Polyteben II.

2. In allen Organen, ausgenommen den oben angeführten, überwiegt der PolytebenII-Anteil.

Man darf daraus wohl schließen, daß der Carbazon-Rest der wirkungsvollere Anteil ist.

Es ergibt sich also, wie beim Conteben und Thiosemicarbazid, eine geradezu spezifische Speicherung des Carbazon-Anteils des Polytebenmoleküls (Polyteben II) *in der Nebenniere.*

3. Niere und Milz lassen als einzige Organe eine bevorzugte Speicherung des Sulfonanteils (Polyteben I) erkennen.

In einer früheren Mitteilung[11] wurden bereits Versuche mit dem Ziel einer Klärung der Ausscheidungsverhältnisse von Polyteben erwähnt.

Die nachstehenden Kurven (Abb. 2) zeigen die Mittelwerte der Urin- und Kotausscheidung in verschiedenen Tagen nach einmaliger intrapleuraler bzw. intraperitonealer Applikation von 50 mg Polyteben bei insgesamt 12 Ratten (Mittelgewicht 110 g). Die maximalen und minimalen Streuwerte aus den täglich erfolgten 12 Einzelbestimmungen sind mit eingezeichnet.

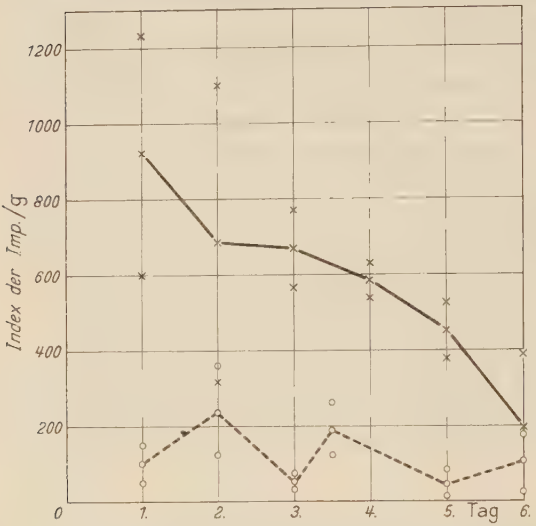


Abb. 2. Ausscheidung der absol. Mengen von Polyteben II im Kot und Urin nach einmaliger Appl. von 50 mg Polyteben intraperitoneal bzw. intrapleural. (Mittelwerte von 12 Versuchstieren.) (Bei der langen *Halbwertzeit* [87,6 Tage] spielt der Abfall der Aktivität während des Versuches [6 Tage] keine Rolle.)
——— × Urinausscheidung.
------ o Kotausscheidung,

Zusammenfassung.

Für das Thiosemicarbazonderivat Polyteben konnte nachgewiesen werden, daß es in der Nebenniere gespalten vorliegt und daß in diesem Organ eine geradezu spezifische Speicherung des Carbazonanteils erfolgt, wie das auch für Conteben und Thiosemicarbazid zutrifft.

Auf Grund der vorliegenden Befunde mit Conteben, Thiosemicarbazid, Thioharnstoff und Polyteben ist zu folgern, daß für die Nebennierenwirkung der Carbazonrest die entscheidende Rolle spielt.

Literatur.

[1] Braedel, H.-U.: Medizin Heute **11** (1954). — [2] Domagk, G.: Beitr. Klin. Tbk. **101** (1948). — [3] Heilmeyer, I. u. L.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 424 (1950). — [4] Heilmeyer, I. u. L.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 313 (1950). — [5] Hinrichs, K., u. Mitarb.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 193 (1953). — [6] Hinrichs, K., u. Mitarb.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 6 (1954). — [7] Hinrichs, K., u. Mitarb.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 513 (1954). — [8] Kaminsky, A., P. Bumaschy et J. Fisbein: Revue des Progres Therapeutiques **22**, 35 (1953). — [9] Lorenz, E.: Wien. klin. Wschr. **1954**, 62. — [10] Müller, E., u. Th. Höller: Praxis (Bern) **1954**, 48. — [11] Poppe, H., u. Mitarb.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 598 (1954).

Dr. H. Poppe, Göttingen, Chirurgische Universitäts-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 149—158 (1955).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. K. Matthes).

Über die Abhängigkeit der Druck- und Flußänderungen in der Aorta ascendens vom Blutdruck während Arterenolinfusion*.

Von
K. Mechelke und E. Nusser**.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. September 1954.)

Während der Arterenoldauerinfusion fanden wir eine Aortenflußabnahme bei gleichzeitiger Druckerhöhung. Nach Gabe von „Regitin" (2-[N-p-Tolyl-N-m-oxyphenyl-amino-methyl]-imidazolin) wurde während der anschließenden Arterenolinfusion mit dem eintretenden Blutdruckanstieg eine Zunahme des Aortenflusses festgestellt[4]. Da nach Regitin immer eine anhaltende, erhebliche Blutdrucksenkung beobachtet wurde, interessierte uns die Frage, ob das verschiedene Flußverhalten während der Arterenolinfusion von der Ausgangsblutdruckhöhe abhängig ist. Ergänzend haben wir die Beeinflussung der Arterenolwirkung durch „Vasculat" (1-[4-oxyphenyl]-1-oxy-2-n-butylamino-aethan-sulfat) untersucht, da mit diesem Pharmakon Unterbrechungen der Kreislaufzentralisation erzielt wurden[2, 5, 6].

Methodik.

Die Messung des Aortenflusses in der Aorta ascendens erfolgte mit dem density-flow-meter nach Dawes, Mott u. Vane[3]. Gleichzeitig wurde der Blutdruck mit einem Quecksilbermanometer aufgezeichnet. Zur Flußschreibung wurde ein Braun-Heuwingscher Ordinatenschreiber verwendet. Der Strömungswiderstand wurde nach der Formel $\frac{\text{Mitteldruck} \times 1221}{\text{Fluß / Sekunde}}$ dyn $\times$ cm $\times$ sec^{-5} errechnet.

Katzen im Gewicht von 2,1—3,5 kg wurden mittels Chloräthyl, Äther und nachfolgender Chloralosegabe von 60 mg/kg narkotisiert. Das Einführen des Flußmessers zwischen die Aortenklappen und den Truncus brachiocephalicus erfolgte nach der von Barer u. Nusser[1] für die Arteria pulmonalis angegebenen Technik. Um den Blutdruck auf Werte von 50—80 mm Hg zu senken, wurden Blutentnahmen zwischen 6 und 20 ml (3—7 ml/kg) durchgeführt. In einigen Versuchen wurde der erniedrigte Druck durch Bluttransfusionen von 7—23 ml (4—8 ml/kg) erhöht. Die Infusionen und Injektionen erfolgten in den abführenden Schenkel des Flußmessers. Vasculatdosis: 5 mg/kg; Regitindosis: 0,6 mg; Arterenolinfusionsdosis: 25 γ/kg/min.

* Herrn Prof. Dr. K. Matthes zum 50. Geburtstag gewidmet.

** Unter Mitarbeit von Dr. W. Hey.

Ergebnisse.

1. Arterenolinfusion nach Regitingabe. a) Infusionsbeginn bei niedrigen Druckwerten und Wiederholung der Infusion nach vorheriger Druckerhöhung durch Bluttransfusion (3 Versuche).

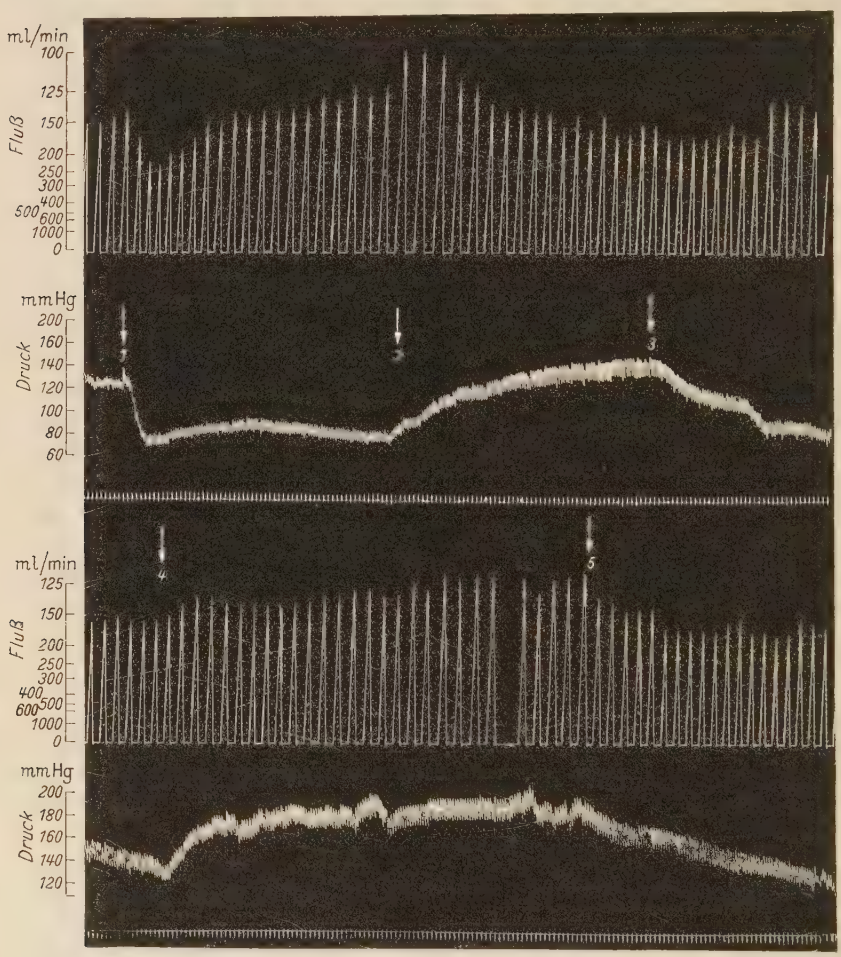


Abb. 1. Versuch Nr. D, Katze 2,5 kg, männlich. Druck- und Aortenflußänderungen. 1. 0,6 mg Regitin, 2.—3. Arterinolinfusion 25 γ/kg/min, 3.—4. Bluttransfusion von 15 ml (6 ml/kg), 4.—5. Arterenolinfusion 25 γ/kg/min. Zeitschreibung 5 sec.

Nach Regitin wird ein Druckabfall bei gleichzeitiger Flußzunahme beobachtet (Abb. 1). Danach nimmt der Fluß ab bei anhaltend erniedrigtem Druck. Während der Arterenolinfusion steigt der Druck an und der Fluß nimmt zu. Nach Transfusion erreichen Druck und Fluß nahezu

Tabelle 1a. *Druck- (P), Fluß- (F) und Widerstandsänderungen (W).*

1. Ausgangswerte, 2. nach Regitin (0,6 mg) vor der ersten Arterenolinfusion, 3. während der ersten Arterenolinfusion, 4. nach Absetzen der ersten Arterenolinfusion vor Bluttransfusion, 5. nach Bluttransfusion vor der zweiten Arterenolinfusion, 6. während der zweiten Infusion, 7. nach Absetzen der zweiten Infusion.

	1			2			3			4			5			6			7		
Nr.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm g	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.
A	130	190	550	60	125	380	210	180	870	65	135	340	110	175	600	170	90	1380	110	130	620
B	125	120	760	65	75	630	115	100	840	60	75	580	120	120	730	200	80	1850	105	95	815
C	140	180	570	55	80	500	185	170	830	60	95	480	120	145	600	160	85	1380	125	150	610

Tabelle 1b. *Druck-, Fluß- und Widerstandsänderungen.*

1. Ausgangswerte, 2. nach Regitin (0,6 mg) vor der Bluttransfusion, 3. nach Bluttransfusion vor der ersten Arterenolinfusion, 4. während der ersten Infusion, 5. nach Absetzen der Infusion vor Blutentnahme, 6. nach Blutentnahme vor der zweiten Arterenolinfusion, 7. während der zweiten Infusion, 8. nach Absetzen der Infusion.

	1			2			3			4			5			6			7			8		
Nr.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Eing.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.
a	130	115	830	55	55	720	130	110	870	210	70	2200	120	95	920	60	70	630	140	90	1140	65	73	650
b	140	135	760	70	95	540	135	140	720	190	85	1610	130	140	680	70	90	570	175	125	1030	75	85	640
c	115	110	760	60	65	670	100	105	700	160	65	1780	105	110	710	60	70	620	145	105	1020	65	80	595

ihre Ausgangswerte. Während der folgenden Infusion tritt mit der Druckerhöhung eine Flußabnahme auf. Nach dem Absetzen der Infusion sinkt der Druck ab und der Fluß nimmt zu.

Vergleicht man die Werte der optimalen Flußzunahme der Arterenolinfusionen, die bei erniedrigten Blutdruckwerten beginnen, mit den Flußwerten des „unbeeinflußten Kreislaufs", so ergibt sich eine weitgehende Übereinstimmung (Tab. 1a).

Tabelle 2a. *Druck-, Fluß- und Strömungswiderstandsänderungen während der Arterenolinfusion nach vorheriger Blutdrucksenkung durch Blutentnahme.*

	Vor der Infusion			Während der Infusion			
Nr.	P mm/Hg	F ml/min	W Einh.	P mm/Hg	F ml/min	W Einh.	Infusionsdauer sec
P_1	50	90	440	125	105	950	450
P_2	50	85	470	95	105	735	490
K_1	60	95	315	185	140	1055	620
K_2	65	125	415	135	210	515	750
K_3	50	125	328	115	210	620	740

b) Vor Infusionsbeginn wird der erniedrigte Blutdruck (Regitinwirkung) durch Bluttransfusion erhöht und anschließend beim gleichen Tier vor einer zweiten Infusion durch Blutentnahme erniedrigt (3 Versuche).

Die Bluttransfusion führt gleichzeitig zu einer Flußzunahme und zur Erhöhung des peripheren Strömungswiderstandes. Während der anschließenden Arterenolinfusion nimmt der Fluß ab bei ansteigendem Druck. Nach erneuter Drucksenkung durch Blutentnahme bewirkt die Infusion eine Flußzunahme (Tab. 1b). Die Blutmengen, welche zur Druckerniedrigung entnommen werden, entsprechen denjenigen, welche zur Druckerhöhung transfundiert werden müssen.

2. Arterenolinfusion bei verschiedener Blutdruckhöhe (9 Versuche). Während der Infusion, die bei erniedrigtem Blutdruck beginnt, tritt regelmäßig mit ansteigendem Druck eine Zunahme des Flusses und eine Erhöhung des Strömungswiderstandes auf (Tab. 2a). Erhöht man nach Absetzen der ersten Infusion den Blutdruck durch Retransfusion, so wird bei erneuter Infusion eine Flußabnahme und Druckerhöhung beobachtet (Tab. 2b, Abb. 2). Beim gleichen Tier wird bei „unbeeinflußtem Kreislauf" während der Infusion eine Flußabnahme und nach Blutentnahme eine Flußzunahme festgestellt (Tab. 2c).

3. Beeinflussung der Arterenolinfusion durch Vasculat (7 Versuche). Wie die Abb. 3 als Beispiel zeigt, unterbricht Vasculat die während der

Tabelle 2b. *Druck-, Fluß- und Widerstandsänderungen während der Arterenolinfusion bei unterschiedlicher Ausgangsblutdruckhöhe.* Erste Infusion: nach Blutdrucksenkung durch Blutentnahme. Zweite Infusion: nach Retransfusion.

	vor der Infusion			während der ersten Infusion				nach der Infusion			vor der Infusion			während der zweiten Infusion				nach der Infusion		
Nr.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	Infusionsdauer sec	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	Infusionsdauer sec	P mm Hg	F ml/min	W Einh.
A	45	65	550	130	90	1150	430	50	67	590	115	140	670	190	90	1700	220	100	100	800
P28	70	80	690	175	115	1220	520	70	84	660	120	130	750	195	95	1640	310	120	115	830

Tabelle 2c. *Druck-, Fluß- und Widerstandsänderungen während der Arterenolinfusion bei unterschiedlicher Ausgangsblutdruckhöhe.* Erste Infusion: unbeeinflußter Kreislauf. Zweite Infusion: nach Blutdrucksenkung durch Blutentnahme.

	vor der Infusion			während der ersten Infusion				nach der Infusion			vor der Infusion			während der zweiten Infusion				nach der Infusion		
Nr.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	Infusionsdauer sec	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	P mm Hg	F ml/min	W Einh.	Infusionsdauer sec	P mm Hg	F ml/min	W Einh.
P17	115	133	695	180	75	1920	460	105	125	670	70	85	670	150	143	845	520	65	75	690
P16	120	130	737	175	85	1650	490	120	120	800	60	80	600	135	125	870	470	65	80	650

Arterenolinfusion eingetretene Druckerhöhung und Flußabnahme. Mit dem Druckabfall und der Flußzunahme tritt eine erhebliche Verminde-

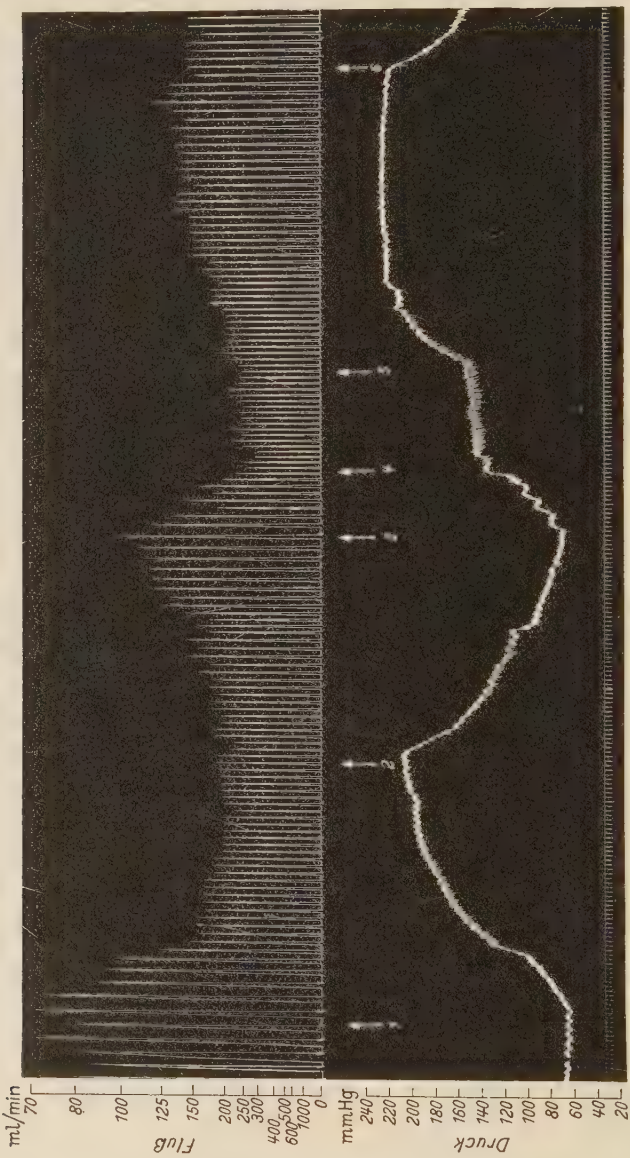


Abb. 2. Versuch Nr. P 19, Katze 2,8 kg, weiblich. Druck- und Aortenflußänderungen. Ausgangswerte nach Blutentnahme von 17 ml (6,1 ml/kg). 1.—2. Arterenolinfusion von 25 γ/kg/min. 2.—3. nach Absetzen der Infusion, 3.—4. Transfusion von 19 ml Blut (6,8 ml/kg), 4.—5. nach Transfusion, 5.—6. Arterenolinfusion von 25 γ/kg/min. Zeitschreibung 5 sec.

rung des vorher stark erhöhten Gesamtströmungswiderstandes ein (Tab. 3). Bei Fortsetzung der Infusion wird mit dem Wiederanstieg des Blutdrucks bei gleichzeitiger Flußabnahme eine Erhöhung des

Strömungswiderstandes gefunden. Die Werte für den Strömungswiderstand erreichen jedoch nicht diejenigen vor Vasculatinjektion.

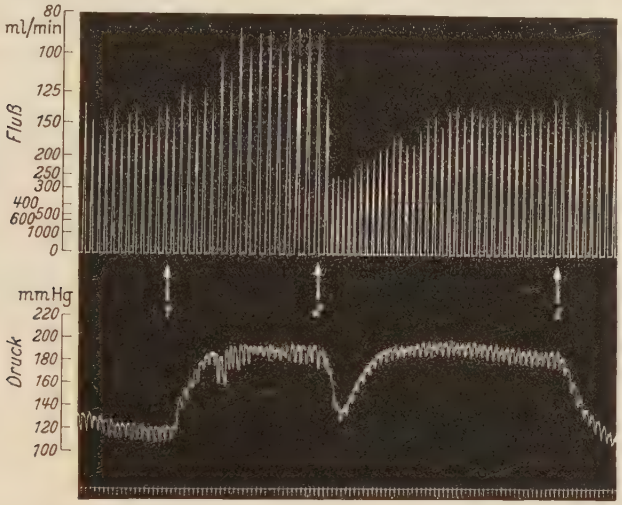


Abb. 3. Versuch Nr. 9, Katze 2,6 kg, männlich. Druck- und Aortenflußänderungen. 1.—3. Arterenolinfusion 25 γ/kg/min, 2. Vasculatinjektion 5 mg/kg. Zeitschreibung 5 sec.

In 10 weiteren Versuchen wurde nach Durchführung dieser Untersuchung vor einer zweiten Arterenolinfusion der Blutdruck durch Blutentnahme auf Werte von 55—80 mm Hg gesenkt. Bei dieser niedrigen Blutdrucksausgangslage ist der periphere Widerstand vermindert. Jetzt

Tabelle 3. *Mittelwerte der Druck-, Fluß- und Strömungswiderstandsänderungen* (7 Versuche).

	Druck %	Fluß %	Strömungswiderstand %
Vor Beginn der Arterenolinfusion (Ausgangswerte)	100% = 112 mmHg	100% = 149 ml/min	100% = 615 Einh.
280 sec nach Beginn der Arterenolinfusion (unmittelbar vor Vasculatgabe)	173	58	318
21 sec nach Vasculat (5 mg/kg) bei kontinuierlich fortgesetzter Arterenolinfusion	107	112	94
665 sec nach Vasculatgabe bei kontinuierlich fortgesetzter Arterenolinfusion	149	71	210
150 sec nach Absetzen der Arterenolinfusion	95	83	99

tritt regelmäßig während der Infusion eine kontinuierliche Fluß- und Widerstandszunahme mit der Druckerhöhung auf. Die Flußzunahme der zweiten Infusion erreicht die Ausgangswerte. Dagegen steigen der Druck und der periphere Strömungswiderstand während der zweiten Infusion über die Ausgangswerte an.

Tabelle 4.

Mittelwerte der Druck-. Fluß- und Strömungswiderstandsänderungen (10 Versuche).

	Druck %	Fluß %	Strömungswiderstand %
Vor Beginn der Arterenolinfusion (Ausgangswerte)	100% = 115 mm Hg	100% = 162 ml/min	100% = 620 Einh.
290 sec nach Beginn der Arterenolinfusion (unmittelbar vor Vasculatgabe)	171	64	298
22 sec nach Vasculat (5 mg/kg) bei kontinuierlich fortgesetzter Arterenolinfusion	111	118	88
550 sec nach Vasculatgabe bei kontinuierlich fortgesetzter Arterenolinfusion	155	83	199
120 sec nach Absetzen der Arterenolinfusion	84	89	95
Nach Blutentnahme vor Beginn der zweiten Arterenolinfusion	55	81	75
395 sec nach Beginn der zweiten Arterenolinfusion	119	100	125
170 sec nach Absetzen der zweiten Arterenolinfusion	57	76	76

Zusammengefaßt ergibt sich, daß während der Arterenolinfusion regelmäßig eine Erhöhung des Blutdrucks und des peripheren Strömungswiderstandes eintritt. Der Fluß zeigt ein verschiedenes Verhalten. Bei einer Blutdruckausgangslage von 55—80 mm Hg wird während der Infusion eine Flußzunahme festgestellt. Beträgt der Blutdruck vor Infusionsbeginn jedoch über 100 mm Hg, so wirkt Arterenol flußvermindernd.

Besprechung der Ergebnisse.

Die vasoconstrictorische Arterenolwirkung führt immer zu einer Druckerhöhung und Zunahme des peripheren Strömungswiderstandes. Die gleichzeitig auftretenden Flußänderungen sind von der bei Infusionsbeginn bestehenden Blutdruckhöhe abhängig. Während der Arterenolinfusion wird bei „unbeeinflußtem Kreislauf" die Abnahme des Aorten-

flusses durch die erhebliche Zunahme des Gesamtströmungswiderstandes erzwungen. Bei erniedrigtem Ausgangsblutdruck kann das Herz während der Arterenolinfusion sein Fördervolumen erhöhen, da der absolute Wert des peripheren Widerstandes niedriger liegt und eine Zunahme des venösen Rückflusses wahrscheinlich ist. Die Durchblutungseinschränkung peripherer Gefäßgebiete wird zu einer Zunahme der zirkulierenden Blutmenge in zentralen Gefäßen führen. Der Aortenfluß nimmt zu, da die Volumenarbeit des Herzens durch die Erhöhung des Gesamtströmungswiderstandes nicht eingeschränkt wird.

Eine Blutdrucksenkung durch Blutentnahme auf Werte von 50 bis 80 mm Hg führt gleichzeitig zu einer Verminderung von Aortenfluß und peripherem Widerstand. Die Abnahme des peripheren Gesamtströmungswiderstandes ist bemerkenswert, da nach Blutentnahme ein gegensätzliches Verhalten zu erwarten wäre. Wiggers[7], der nach Entblutung ebenfalls einen erniedrigten peripheren Gesamtströmungswiderstand findet, erklärt diesen Befund mit einem verschiedenen Verhalten der Teilwiderstände.

Die Flußzunahme während der Arterenolinfusion nach vorheriger Regitingabe kann in gleicher Weise erklärt werden, nur daß hierbei die deutliche Erniedrigung des peripheren Widerstandes als spezifische Regitinwirkung berücksichtigt werden muß. Während der Arterenolinfusion erfolgt eine geringe Erhöhung des herabgesetzten Strömungswiderstandes über die Ausgangswerte sowie eine Zunahme des venösen Rückflusses. Da der Widerstand nicht so stark ansteigt, daß die Volumenarbeit des Herzens vermindert wird, tritt eine Aortenflußzunahme auf. Die kurzfristige Drucksenkung und Abnahme des Strömungswiderstandes nach Vasculat erklärt die nur vorübergehend auftretende Unterbrechung der Flußabnahme während der Arterenolinfusion.

Zusammenfassung.

Mit dem Flußmesser nach Dawes, Mott u. Vane wurden in der Aorta ascendens der Katze während der Arterenolinfusion von 25 γ/kg/min folgende Änderungen von Fluß, Druck und Strömungswiderstand festgestellt:

1. Die vasoconstrictorische Arterenolwirkung bewirkt immer eine Druckzunahme und Erhöhung des peripheren Strömungswiderstandes bei verschiedenem von der Blutdruckausgangshöhe abhängigem Flußverhalten. Nach der Blutentnahme von 3—7 ml/kg tritt eine Druckerniedrigung auf Werte von 50—80 mm Hg sowie eine Flußabnahme und Senkung des peripheren Strömungswiderstandes auf. Während der Arterenolinfusion, die von solchen erniedrigten Druckwerten ausgeht, wird eine Flußzunahme beobachtet.

2. Erhöht man den nach Regitin anhaltend erniedrigten Blutdruck bei abnehmendem Aortenfluß durch Bluttransfusion, so bewirkt die anschließende Arterenolinfusion keine Flußzunahme, sondern eine Abnahme während der Drucksteigerung.

3. Vasculat unterbricht kurzfristig die während einer Arterenolinfusion eintretende Flußabnahme und Drucksteigerung.

Literatur.

[1] Barer, G. R., and E. Nusser: J. of Physiol. (im Druck). — [2] Buhr, G.: Ärztl. Forsch. **6**, I/409 (1952). — [3] Dawes, G. S., J. C. Mott and J. R. Vane: J. of Physiol. **121**, 72—79 (1953). — [4] Dittmar, H. A., K. Mechelke u. E. Nusser: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 75 (1954). — [5] Duesberg, R.: Nauheimer Fortbildungslehrgänge **15**, 66 (1950). — [6] Krauss, H., u. A. Miehlke: Dtsch. med. Wschr. **1950**, 1524. — [7] Wiggers, C. J.: Physiology of Shock. New York: The Commonwealth Fund 1950.

Privatdozent Dr. K. Mechelke,
Med. Univ.-Klinik, Heidelberg, Bergheimerstraße 58.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 159—175 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. B. Behrens).

Über die Verteilung von Substanz P und Cholinacetylase im Gehirn*.

Von
Gerhard Zetler und Lucie Schlosser**.

(Eingegangen am 15. Juli 1954.)

Bei der Untersuchung von Gehirnextrakten aus dem Gebiete der Medulla oblongata erhielten wir aus der Ala cinerea bzw. Area postrema an isolierten Darmpräparaten auffallend starke Wirkungen. Das wirksame Agens war resistent gegenüber Kochen in schwach saurem Milieu, Desaminierung und Behandlung mit Formaldehyd, war löslich in Wasser und Äthanol, dialysabel, ließ sich mit Ammoniumsulfat fällen und wurde durch Trypsin und Chymotrypsin sowie durch Kochen in alkalischem Milieu zerstört; es handelte sich also um Substanz P (SP). Nach unseren ersten Versuchen war bereits klar, daß die SP-Konzentration in der Ala cinerea weitaus höher sein mußte als im übrigen Gehirn, etwa in den Basalganglien. Schon von Euler u. Gaddum (1931), die Entdecker von SP, hatten ebenso wie später Gullbring (1943) gefunden, daß SP im Gehirn nicht gleichmäßig verteilt vorkommt, sondern daß die Basalganglien mehr SP enthalten als die Hirnrinde. Jedoch erst vor kurzem erschienen zwei Arbeiten, die sich systematisch mit der Verteilung von SP im Gehirn befassen (Pernow 1953; Kopera u. Lazarini 1953).

Leider konnten die Autoren dieser beiden Arbeiten noch nicht die Tatsache berücksichtigen, daß im Gehirn und in Hirnextrakten 5-Hydroxytryptamin (Enteramin, Serotonin) vorkommt (Amin, Crawford u. Gaddum, zit. nach Vogt 1953 sowie Erspamer 1954; Twarog u. Page 1953; Zetler u. Schlosser 1954). Wie Feldberg u. Toh (1953) zeigten, entstehen bei der SP-Auswertung am Ileum des Meerschweinchens zu hohe Werte, wenn in den Extrakten auch Enteramin enthalten ist. Durch Blockierung der für Enteramin empfindlichen Tryptamin-Rezeptoren des Ileums durch dauernde hohe Konzentrationen von Tryptamin in der Suspensionslösung kann diese Fehlerquelle ausgeschaltet werden (Gaddum 1953).

Die Zahlenwerte beider Arbeiten können nicht miteinander verglichen werden; während nämlich Pernow (1953) mit einem Standard-SP-Pulver arbeitete und seine gefundenen Werte in SP-Einheiten pro Gramm Frischgewicht ausdrückte, bezogen Kopera u. Lazarini (1953) die Wirksamkeit der Extrakte aus je 1 g

* Mit dankenswerter Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Ein Teil der Ergebnisse wurde in kurzer Form bereits publiziert (Naturwissenschaften 40, 559 (1953); 41, 46 (1954), sowie Pflügers Arch. 259, 303—305 (1954).

** Diese Arbeit ist unserem verehrten Chef, Herrn Prof. Dr. B. Behrens, zum 60. Geburtstag gewidmet.

Gehirngewebe (frisch) auf die Wirksamkeit eines Extraktes aus je 10 mg Darmgewebe (frisch). Es konnten somit allenfalls relative Werte, nämlich die quantitativen Beziehungen zwischen den einzelnen Hirnpartien miteinander verglichen werden. Die Benutzung eines rohen Darmextraktes als SP-Standard enthält eine weitere erhebliche Fehlerquelle, da Darmextrakte abgesehen von Acetylcholin und Histamin außer SP auch eine große Menge Enteramin enthalten (Dalgliesh, Toh u. Work 1953; Feldberg u. Toh 1953; Erspamer 1953). Schließlich ist die Zahl der Versuche bei beiden Autoren gering; während Pernow 5 Hundegehirne untersuchte, weist die Tabelle von Kopera u. Lazarini (6 Rinder- und 2 Katzengehirne) für mehrere Hirnpartien nur einen einzigen Wert auf (maximal 4 Werte, meist 2—3 Werte).

Da es uns somit nicht möglich war, an Hand von Angaben der Literatur die von uns in der Ala cinerea gefundenen SP-Konzentrationen mit den in anderen Arealen vorhandenen zu vergleichen, unternahmen wir die zu schildernden Versuche. In der Hoffnung, einen Hinweis auf die Bedeutung der eigentümlichen Verteilung von SP zu erhalten, prüften wir bei einer Reihe geeigneter Gehirnpartien auch die Aktivität der Cholinacetylase; bekanntlich ist nach Feldberg u. Vogt (1948) die von Areal zu Areal wechselnde Aktivität der Cholinacetylase ein Maßstab für die jeweils vorhandene Anzahl cholinergischer Neurone (vgl. auch Feldberg 1950, 1951).

Wir werden hier immer von „Aktivität" der Cholinacetylase sprechen. Nach Feldberg (persönl. Mitteilung) ist es eine Ermessensfrage, ob man statt dessen nicht besser von Konzentration sprechen sollte. Nach Feldbergs Meinung ist die im Experiment gefundene Aktivität des Ferments jedoch von der Zahl der cholinergischen Neurone abhängig und nicht der Ausdruck einer mehr oder weniger intensiven Acetylcholinsynthese in einer gleichbleibenden Zahl von Neuronen (Feldberg u. Vogt 1948).

Material und Methode.

Gehirnmaterial[1]. Nach Gaddum u. Schild (1934/35) ist SP sehr resistent gegen postmortale Autolyse. Dies können wir bestätigen: Je 5 unserer 10 Rindergehirne waren 24 bzw. 48 Std alt; die Aufschlüsselung der Zahlenwerte ergab keinen Einfluß der post mortem verstrichenen Zeit auf den SP-Gehalt. Dies gilt auch für die menschlichen Gehirne, über die Tab. 1 einen Überblick gibt; bei Gehirn 1—10 wurde SP, bei Gehirn 11—13 Cholinacetylase bestimmt. Die jugendlichen Gehirne 4 u. 6 sind wegen der besonderen Krankheits- bzw. Todesumstände sicher als normal im engeren Sinne zu betrachten.

Substanz P. Wir stellten uns ein Standard-Pulver nach der Methode von von Euler (1942) aus Rindergehirn her. Von Eulers beste Präparate enthielten bei dieser Herstellungsart 5,9 E/mg, unser Pulver 5,5 E/mg; wir standardisierten unser Material nach einem Präparat, das uns Herr Dr. Pernow (Stockholm) in dankenswerter Weise überlassen hatte. Da SP bisher noch nicht in reiner Form vorliegt, muß man sich biologischer „Einheiten" von Eulers (1942) bedienen; wir wählten die von Pernow (1953) definierte SP-Einheit: „Eine Einheit entspricht der Wirksamkeit von 7—10 Schwellendosen am isolierten Ileum des Meerschweinchens in

[1] Wir danken Herrn Professor Dr. W. Büngeler ergebenst für die freundliche Überlassung von Sektionsmateiral des Pathologischen Instituts der Universität Kiel.

3 ml Tyrodelösung." Alle unsere Angaben über SP-Konzentrationen sind also in Einheiten pro Gramm Feuchtgewicht ausgedrückt. — Wir möchten auch späteren Untersuchern vorschlagen, diese Maßeinheit anzuwenden, damit die Ergebnisse vergleichbar werden. Noch günstiger wäre es, wenn von Eulers Institut ein Standardpulver bereithalten würde, mit dem jeder Experimentator sein eigenes Material eichen könnte. — Den SP-Gehalt unserer Hirnextrakte werteten wir am isolierten Ileum des Meerschweinchens aus. Die Suspensionslösung enthielt Atropin, Neoantergan und Tryptamin in den von Feldberg u. Toh (1953) angegebenen Konzentrationen; der Darm war also nicht nur für Histamin und Acetylcholin sondern auch für Enteramin unempfindlich. — Die Hirnpartien wurden nach Wägung mit etwas Seesand im Mörser zerrieben, mit mindestens der dreifachen Menge an Extraktionslösung aufgeschwemmt, auf dem Wasserbad zweimal kurz aufgekocht und filtriert; nach Eindampfen auf dem Wasserbad wurde der Rückstand in Ringer-Lösung aufgenommen, neutralisiert und filtriert. Die Extraktionslösung bestand aus Aqua dest. und Methanol 1 : 1, mit H_2SO_4 auf p_H 2—3 angesäuert.

Tabelle 1.

Nr.	Geschlecht	Alter Jahre	Gewicht kg	Zeit p. m. Stunden	Diagnose
1	m	65	62,0	42	Herzinsuff., Lungenembolie
2	m	82	59,5	19	Prostata-Ca, Pneumonie
3	m	62	61,5	39	Herzwand-Aneurysma
4	w	23	75,0	30	Lungenembolie
5	m	75	50,6	27	Rectum-Ca, Herzinsuffizienz
6	m	22	52,5	41	Leber-Ruptur (Unfall)
7	w	71	56,0	14	Pankreas-Ca, Lungenembolie
8	m	51	60,5	24	Magen-Ca, Pneumonie
9	m	49	51,0	34	Ulcus duodeni perforatum
10	w	72	33,0	30	Oesophagus-Ca
11	m	86	71,0	3,5	Lungenembolie nach Fraktur
12	w	66	55,0	4,0	Gallenblasen-Ca
13	w	17	54,0	4,5	Tbc, Laparatomie, Embolie

Zu Nr. 4: Die Lungenembolie trat im Anschluß an eine kleinere neurologische Operation am peripheren Nervensystem wegen chronischer Neuralgie auf.

Cholinacetylase. Alle Versuche wurden mit einer Ausnahme, die bei der Beschreibung der Ergebnisse besonders erwähnt ist, an Gehirntrockenpulver vorgenommen; dieses Pulver stellten wir nach Korey, de Braganza u. Nachmansohn (1951) mittels Aceton bei Temperaturen unter 1° C her. Das Vorgehen bei der Bestimmung der Aktivität der Cholinacetylase richtete sich genau nach Feldberg u. Vogt (1948). Nur bei den Autolyse-Versuchen an den Gehirnen von Ratten fügten wir zu den Ansätzen Coenzym A, das wir als Trockenpulver nach Nachmansohn u. Berman (1946) aus Meerschweinchenleber hergestellt hatten. In Kontrollversuchen ohne Coenzym A war die Synthese von Acetylcholin nicht geringer; Coenzym A ist also durchaus entbehrlich, wenn die Synthese dank der Anwesenheit von Adenosintriphosphat und Citrat bereits optimal verläuft [dies hatten schon Feldberg u. Vogt (1948) festgestellt]. Die Aktivität der Cholinacetylase wird ausgedrückt als die in 1 Std bei 37° C von 1 g Trockenpulver gebildete Acetylcholinmenge in Mikrogramm (μg).

Statistik. Die statistische Auswertung beschränkte sich auf den Vergleich von Mittelwerten zweier Beobachtungsreihen nach allgemein bekannten Formeln, die

auch bei Zetler (1952) zu finden sind; die t-Verteilung von Student wurde berücksichtigt. Ein Unterschied zwischen zwei Mittelwerten wurde dann als sicher angenommen, wenn $p \leqq 0{,}05$ war. In den Tabellen bedeutet ε den mittleren Fehler des Mittelwertes.

Ergebnisse.

1. Die Verteilung von Substanz P im Gehirn.

Durch die in der Einleitung erwähnten Beobachtungen war noch nicht entschieden, ob der offenbar sehr hohe SP-Gehalt unserer Extrakte wirklich der Ala cinerea zuzuschreiben sei. Denn dieses Gebiet wird von der dünnen Schicht der Area postrema teilweise überdeckt, die wegen ihrer eigentümlichen Struktur teils als Bildungsort des Liquor cerebrospinalis (Wislocki u. Leduc 1952) teils als neurovegetatives Kerngebiet angesehen wird (Cammermeyer 1946/47); Amin, Crawford u. Gaddum (zit. nach Erspamer 1954) und M. Vogt (1954) fanden in der Area postrema des Hundes eine besonders hohe Konzentration von Enteramin (0,217 μg/g frisch). — Wir trennten die Area postrema von der Ala cinerea des Rindes vollkommen ab und vereinigten wegen des geringen Gewichts der Area postrema die Partien von je 4 Gehirnen zu einer Probe; diese Proben wogen (frisch) bei Ala cinerea im Mittel etwa 75 mg; bei Area postrema 6,5—12 mg. Die Ergebnisse, die wir bei 10 Proben von insgesamt 40 Rindergehirnen erzielten, zeigt Tab. 2.

Tabelle 2.

Probe Nr.	Ala cinerea E/g	Area postrema E/g
1	475	151
2	470	< 60
3	450	< 15
4	338	< 12
5	305	103
6	328	< 22
7	450	< 23
8	436	83
9	423	< 11
10	388	100

Die meisten Extrakte aus Area postrema waren wirkungslos; deshalb konnte nur der Vergleich mit ebenfalls gerade unwirksamen Dosen des SP-Standards vorgenommen werden. Die höheren Werte von Area postrema bei Probe Nr. 1, 5, 8 und 10 sind wohl auf eine Verunreinigung mit Ala cinerea-Material zurückzuführen. Die Ergebnisse in Tab. 2 erlauben nur folgende Deutung: Im Gebiet der Area postrema sind — wenn überhaupt — nur unbedeutende SP-Mengen vorhanden; demnach ist die pharmakologische Aktivität unserer Extrakte aus dem Bereich der Area postrema und Ala cinerea ausschließlich dem SP-Gehalt der Ala cinerea zuzuschreiben.

Die Untersuchung des SP-Gehaltes von je 11 verschiedenen Gebieten bei 10 Rindergehirnen ergab (Tab. 3), daß die SP-Konzentration der Ala cinerea die der übrigen untersuchten Partien weit überragt. Bereits die engste Nachbarschaft — Trigonum hypoglossi — enthält nur noch

einen Bruchteil des Ala-Wertes. Der relativ hohe SP-Gehalt von Sub-Ala cinerea ist durch den keilförmigen Fortsatz des Ala-Gewebes in das Material der Medulla zu erklären. Die übrigen Werte der Tab. 3 zeigen, daß SP nicht gleichmäßig über das Gehirn verteilt ist. Auffallend ist der hohe Gehalt der Substantia grisea centralis, ferner der signifikante Unterschied zwischen den Colliculi rostrales und caudales sowie das Fehlen von SP im Cerebellum, wo auch KOPERA u. LAZARINI (1953) nichts gefunden hatten.

Leider erlaubte die beim Gehirn des Rindes gefundene Art der Verteilung noch keine Zuordnung von SP zu bestimmten Funktionen des Gehirns. Das menschliche Gehirn schien uns ein günstigeres Objekt zu sein, besonders da man hier auch von kleineren Gebieten noch genügend Ausgangsmaterial würde gewinnen können, was eine detaillierte Untersuchung ermöglichen würde. Der Auswahl der zu entnehmenden Partien lag folgender Versuchsplan zugrunde:

1. Die zu untersuchenden Gebiete sollten alle prinzipiellen Möglichkeiten der anatomischen Struktur umfassen, d. h. sowohl reine Faserbezirke wie Corpus callosum oder Pes pedunculi

Tabelle 3. *Verteilung von Substanz P (in E/g Frischgewicht) in den Gehirnen von 10 weiblichen Rindern.*

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	Mittel	$\pm s$
Ala cinerea	640	450	728	416	790	338	530	360	237	375	486	56,8
Sub-Ala cinerea[1]	160	87	130	36	90	95	183	126	59	94	106	14,07
Trigonum hypoglossi	45	36	29	22	57	11	47	28	33	33	34	4,14
Hypothalamus	108	32	138	42	133	46	114	51	39	25	73	14,16
Thalamus	33	5	31	11	29	29	26	31	9	7	21	3,97
Nucleus caudatus	110	31	86	91	137	90	149	93	49	40	88	12,35
Substantia grisea centralis[2]	165	130	144	100	250	120	181	126	100	170	149	14,26
Colliculi rostrales	92	92	72	108	80	104	104	91	72	108	92	4,39
Colliculi caudales	97	132	108	102	124	108	113	146	173	116	122	7,32
Decussatio crurum cerebello-cerebralium[3]	138	163	74	104	118	78	98	105	94	108	108	8,44
Cerebellum	1,5	1	1	2	0,5	2	0,6	2,4	1	1,3	1,3	0,64

[1] Ein der Ala cinerea entsprechender Bezirk unter dem Niveau des Bodens des IV. Ventrikels.
[2] Entnommen wurde eine etwa 1 mm tiefe Schicht um den Aquaeductus mesencephali.
[3] Die Proben enthielten wahrscheinlich auch kleinere Partien des Nucleus ruber und der Substantia nigra.

auf der einen Seite, zellreiche Gebiete wie Cortex oder die Basalganglien andererseits. Zwischen diesen beiden Extremen würden die Oliven stehen als Fasergebiete mit einem geringen Gehalt an Ganglienzellen oder die Pons als Fasergebiet mit einer bereits wesentlich stärkeren Durchsetzung mit Ganglienzellen (Nuclei pontis).

2. Es sollten Gebiete untersucht werden, die trotz enger Nachbarschaft bereits makroskopisch erkennbar einen unterschiedlichen Aufbau bzw. Zellgehalt besitzen und deshalb mit Sicherheit isoliert entnommen werden können. Dafür kamen in Frage Putamen und Globus pallidus, ferner Substantia nigra, Nucleus ruber und Substantia grisea centralis.

3. Gebiete mit bekanntermaßen verschiedener Funktion sollten entnommen werden. Dies würde besonders dann interessant sein, wenn diese Gebiete trotz Unterschieden in ihrer Funktion praktisch gleiche Struktur aufwiesen wie Gyrus praecentralis, Gyrus postcentralis und Gyrus cinguli anterior. Die Auswahl des Gyrus cing. ant. muß näher begründet werden: Dieses Gebiet gehört zu den Suppressor-Arealen, von denen das Gehirn des Schimpansen auch auf der Großhirn-Konvexität je zwei frontale und zwei parietale Bänder aufweist. Elektrische Reizung oder Strychninisierung dieser Areale läßt die spontane elektrische Aktivität und die Reizbarkeit der übrigen Hirnrinde sowie die Sehnenreflexe verschwinden und verursacht einen Hypotonus der Skeletmuskulatur. Der Gyrus cing. ant. unterscheidet sich von den übrigen Suppressor-Gebieten dadurch, daß sich hier auch ein sehr potentes vegetatives Zentrum befindet. Es liegen Anhaltspunkte dafür vor, daß diese Verhältnisse auch beim menschlichen Gehirn existieren (Literatur zum Gyrus cing. ant. bei Jefferson 1950 sowie Fulton 1952).

4. Schließlich bot sich die Möglichkeit, an 4 Stellen synapsenreiche Schaltzentren im Verlaufe zentraler sensorischer Bahnen zu untersuchen: Im Bereiche des optischen Systems die Corpora geniculata lateralia und die Colliculi rostrales, beim akustischen System die Corpora geniculata medialia und die Colliculi caudales.

Die von uns ausgewählten 22 Gebiete dürften eine Betrachtung und Auswertung der Ergebnisse nach den eben skizzierten Gesichtspunkten ermöglichen. Tab. 4 faßt die bei diesen Versuchen erhaltenen Ergebnisse zusammen. Soweit es sich an Hand des knappen Materials überhaupt feststellen läßt, war das Alter der Individuen sowie die Zeit post mortem nicht von wesentlichem Einfluß auf die SP-Konzentration. Auffallend ist im Vergleich zu den Rinderversuchen die erheblich geringere Fehlerbreite der Versuchsergebnisse.

Dies mag daran liegen, daß aus den menschlichen Gehirnen die einzelnen Gebiete mit größerer Genauigkeit entnommen werden konnten; die Rinder werden ja durch einen Schuß in den Kopf getötet, wobei Teile des Gehirns zerstört werden. Besonders oft und stark wird dabei das Zwischenhirn geschädigt, dessen korrekte Entnahme deshalb meist schwierig war; daher sind wir auch von der Richtigkeit des auffallend niedrigen Hypothalamus-Wertes beim Rind nicht überzeugt. — Bei dem menschlichen Material sind wesentlich mehr Faktoren im Spiel wie Geschlecht, stark verschiedenes Lebensalter, sehr verschieden lange Zeiten post mortem, Krankheiten, Inanition (Fall Nr. 10) usw. Daß die Fehlerbreite trotzdem kleiner ist als bei den Rindern, kann auch daran liegen, daß alle diese Einflüsse den SP-Stoffwechsel des Gehirns nicht berühren; so unterscheiden sich die beiden sicher als „normal" anzusehenden Gehirne Nr. 4 und 6 praktisch nicht von den übrigen Gehirnen.

Tabelle 4. *Substanz P-Gehalt menschlicher Gehirnpartien (in E/g Frischgewicht).*

Nr.	Gehirnpartie	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	Mittel	± ε
1	Gyrus praecentralis	41	22	82	39	32	61	40	42	38	36	43	5,29
2	Gyrus postcentralis	39	21	75	34	30	54	36	33	35	28	39	4,87
3	Gyrus cinguli anterior	95	49	100	105	98	111	83	87	67	50	85	7,01
4	Corpus callosum	2	0	2	0	1	2	2	3	2	2	2	0,33
5	Putamen	75	34	73	60	51	66	76	100	72	31	64	6,54
6	Globus pallidus	154	61	114	90	153	95	106	117	167	63	112	11,70
7	Nucleus caudatus	85	54	68	43	83	100	143	153	73	43	85	12,08
8	Thalamus	24	13	14	14	12	13	15	6	5	6	12	1,78
9	Hypothalamus	110	77	107	100	104	159	134	79	52	98	102	9,45
10	Corpora mammillaria	67	40	34	27	28	43	31	21	22	30	34	4,26
11	Substantia grisea centralis	126	82	130	110	147	157	117	124	62	132	119	9,00
12	Substantia nigra	780	460	730	570	988	800	746	250	850	814	699	67,90
13	Nucleus ruber	10	10	39	28	86	45	31	17	15	17	30	7,31
14	Colliculi rostrales	70	41	67	70	55	79	29	45	55	39	55	5,16
15	Colliculi caudales	153	91	114	111	153	208	127	164	144	142	141	10,35
16	Corpora geniculata lateralia	4	2	1	8	5	7	5	1	11	6	5	1,00
17	Corpora geniculata medialia	35	26	19	38	47	39	34	40	51	41	37	2,98
18	Pes pedunculi	3	0	2	5	2	4	4	3	3	2	3	0,45
19	Pons	4	0	3	2	2	4	4	3	3	1	3	0,43
20	Ala cinerea	318	153	370	262	276	251	250	100	270	226	248	24,12
21	Trigonum hypoglossi	42	20	48	34	47	29	41	36	26	50	37	3,19
22	Olivae	2	4	1	6	8	3	6	4	4	2	4	0,68

Eine Überraschung stellt die außerordentlich hohe SP-Konzentration in der Substantia nigra dar, hinter der die Ala cinerea weit zurückbleibt. Dabei bestehen wohl keine Beziehungen zum Pigmentgehalt der Substantia nigra; bei den Gehirnen Nr. 4, 6, 8 und 9 war dieses Gebiet zwar besonders schwach gefärbt, enthielt jedoch im Mittel 617 E/g SP.

Trotz enger Nachbarschaft und funktioneller Zugehörigkeit besitzt der Nucleus ruber nur etwa ein Zwanzigstel der SP-Konzentration der Substantia nigra, ganz zu schweigen von der corticofugalen Fasermasse des Pes pedunculi, wo SP nur noch spurenweise vorkommt. Das Mesencephalon, das strukturell so reich gegliedert ist, zeigt also auch hinsichtlich des SP-Gehaltes ein buntes Bild. Diese Behauptung wird noch besonders unterstrichen durch das Verhalten von SP in der Lamina quadrigemina und bei den Corpora geniculata. Wie schon beim Rind enthalten auch beim Menschen die Colliculi caudales signifikant mehr SP als die Colliculi rostrales; diese Differenz ist beim Menschen viel stärker ausgeprägt als beim Rind. Sehr deutlich ist auch der Unterschied zwischen den lateralen und medialen Corpora geniculata, von denen die lateralen SP nur spurenweise enthalten. Hier ergibt sich vielleicht eine Beziehung des SP-Gehaltes zu der Funktion dieser Strukturen insofern, als die Anteile des optischen Systems weniger enthalten als die entsprechenden zum akustischen System gehörigen Gebiete. — Die Substantia grisea centralis weist beim Menschen ebenso wie beim Rind auffallend hohe SP-Konzentrationen auf.

Im Rhombencephalon hatte die Ala cinerea wiederum einen hohen SP-Gehalt, den zweithöchsten nach Substantia nigra. Im Vergleich zum Rind liegt beim Menschen der SP-Gehalt der Ala cinerea niedriger, die im Trigonum hypoglossi des Menschen vorhandene SP-Konzentration (37 E/g) ist jedoch ebenso hoch wie beim Rind (34 E/g). — Zwischen Oliven, Pons, Corpora geniculata lateralia und Corpus callosum bestehen praktisch keine Unterschiede im SP-Gehalt; die SP-Konzentrationen in den Extrakten waren immer so gering, daß die biologische Erfassung der Wirkstoffmengen oft nur mit Mühe gelang. Unterschiede etwa zwischen den Mittelwerten 3 und 4 E/g sind deshalb bedeutungslos.

Im allgemeinen entspricht der makroskopisch-anatomischen Gliederung ein wechselnder Gehalt an SP; dies zeigt deutlich der Unterschied zwischen Globus pallidus und Putamen oder zwischen Thalamus, Hypothalamus und den Corpora mammillaria. - Gyrus prae- und postcentralis enthielten gleichviel SP. Das Fehlen von Unterschieden zwischen diesen beiden corticalen Bezirken ist von Interesse im Hinblick auf die Theorie, wonach SP eine Überträgersubstanz an sensiblen Synapsen sein soll (Lembeck 1953). Dagegen besteht zwischen diesen beiden Gebieten und dem Gyrus cinguli anterior ein signifikanter Unterschied,

da letzteres Gebiet doppelt so viel SP enthält; die Verteilung von SP scheint bei diesen 3 Cortex-Arealen mehr mit Funktionellem als mit Strukturellem Hand in Hand zu gehen.

Nicht signifikant ist der Unterschied zwischen Putamen und Nucleus caudatus, Globus pallidus und Nucleus caudates sowie zwischen Substantia grisea centralis und Hypothalamus.

Die detaillierte Untersuchung der Verteilung von SP im menschlichen Gehirn ließ auch nur den allgemeinen Schluß zu, SP sei vielleicht für die Funktion bestimmter Hirnpartien von mehr oder weniger großer Bedeutung und nicht nur ein „unspezifischer" Baustein des Nervengewebes. Hier führte uns eine Überlegung von Kopera u. Lazarini (1953) weiter, die ihre beim Gehirn von Rind und Katze gewonnenen SP-Werte (eingeteilt in „höchste Werte", „mittlere Werte" und „wenig oder nichts") mit den Cholinacetylase-Werten verglichen hatten, die Feldberg u. Vogt (1948) beim Gehirn des Hundes gefunden hatten.

Sie kamen zu dem Schluß, SP sei an Orten mit geringerer Aktivität der Cholinacetylase besonders reichlich vorhanden, d. h. also an Stellen, an denen nichtcholinergische Neurone überwiegen. Dasselbe Ergebnis erhält man, wenn man unsere SP-Werte zum Vergleich heranzieht. Leider hatten jedoch Feldberg u. Vogt einige uns sehr interessierende Gebiete nicht untersucht. Auch war ein Vergleich der Gehirne verschiedener Spezies miteinander bedenklich, da nach Feldberg u. Vogt die Intensität des Acetylcholinstoffwechsels mit der Höherentwicklung des Gehirns abnimmt. So erschien es uns angebracht, die Verteilung der Cholinacetylase im Gehirn des Menschen zu untersuchen.

2. Die Verteilung der Cholinacetylase.

Zunächst untersuchten wir die Verteilung im Hundegehirn, das bisher nur von Feldberg u. Vogt (1948) sowie Feldberg, Harris u. Lin (1951) untersucht worden ist. Damit wollten wir unsere Methodik kontrollieren und prüfen, ob die Verteilung der Cholinacetylase beim Hund dieselbe ist wie beim Menschen, und weiter, ob das hochentwickelte menschliche Gehirn dieselbe Fähigkeit hat, Acetylcholin zu synthetisieren wie das des Hundes. Aus Tab. 5 geht hervor, daß unsere Werte am Hundegehirn im allgemeinen mit denen von Feldberg u. Vogt übereinstimmen. Das zeigt sich besonders beim Vergleich der Partien 2 und 9: selbst wo Unterschiede in den absoluten Werten bestehen, sind die Relationen zwischen den einzelnen Abschnitten immer gleichsinnig wie z. B. bei den so wichtigen Partien 6, 7, 8 und 9.

Daß keine völlige Übereinstimmung aller Werte vorliegt, muß seinen Grund nicht unbedingt in Unterschieden der Versuchstechniken haben. Nach Welsh u. Hyde (1944) sowie Feldberg (1945) nimmt nämlich der Acetylcholin-Gehalt des Gehirnes, wenigstens beim Meerschweinchen, mit dem Lebensalter zu. Dies könnte einmal durch eine Abnahme der Aktivität der Cholinesterase im Alter verursacht sein; dies ist unseres Wissens bisher noch nicht untersucht worden. Andererseits könnte im Alter die Aktivität der Cholinacetylase vermehrt sein. Dem entspricht,

daß nach Feldberg u. Vogt (1948) die Verteilung von Acetylcholin im Zentralnervensystem nicht der Cholinesterase sondern der Cholinacetylase folgt. Was unsere Versuche angeht, so scheint bemerkenswert, daß die niedrigen Cholinacetylase-Werte des ersten Hundegehirns von einem jungen Hunde stammen, während die hohen Werte des dritten Gehirns zu einem recht alten Hund gehören. Dies bedeutet, daß Divergenzen in den Cholinacetylase-Werten auf einem Unterschied im mittleren Lebensalter der zu den Versuchen verwendeten Hunde beruhen können.

Eine weitere Fehlerquelle entsteht, wenn nicht genau identische Partien verglichen werden. Feldberg, Harris u. Lin (1951) fanden für den Thalamus zwar eine totale Aktivität von 323 μg/g/Std, für die einzelnen Thalamuskerne jedoch durchaus unterschiedliche Werte, z. B. für den Nucleus ventralis 226 μg/g/Std; vielleicht hatten wir vorwiegend dieses Gebiet erfaßt. Ähnliches gilt für den Hypothalamus (Infundibulum 87, Nucleus supraopticus 350 μg/g/Std).

Tabelle 5. *Aktivität der Cholinacetylase verschiedener Abschnitte des Hundegehirns μg ACh/g/Std.*

Nr.	Gehirnpartie	1.	2.	3.	Mittel	Feldberg u. Vogt (1948)
1	Corpus callosum		107	140	124	89
2	Nucleus caudatus	282	450	593	442	435
3	Thalamus	136	178	260	191	323
4	Hypothalamus	68	145	176	130	87
5	Substantia grisea centralis	61	260	200	174	
6	Colliculi rostrales	169	320	378	289	340
7	Colliculi caudales	70	41	176	96	147
8	Corpus geniculatum laterale	188	154	326	256	324
9	Corpus geniculatum mediale	157	208	258	208	204
10	Ala cinerea	220	365	186	257	
11	Trigonum hypoglossi	435	674	394	501	425

Bisher wurde nur ein einziges menschliches Gehirn hinsichtlich der Cholinacetylase untersucht und die Ergebnisse in einer Dissertation niedergelegt (Wajda, 1951). Dieses Gehirn war 1,5 Std alt. Leider wurden auch hier die meisten uns interessierenden Gebiete nicht erfaßt. Da bisher unbekannt ist, wie empfindlich die Cholinacetylase für die postmortale Autolyse ist, die von Wajda nicht berücksichtigt wurde, führten wir Autolysestudien an den Gehirnen von 60 Ratten durch. Die Ratten (beiderlei Geschlechts; Gewicht 200—250 g) wurden in leichter Äthernarkose dekapitiert und die Köpfe vor der Entnahme der Gehirne verschieden lange Zeit bei jeweils konstanten Temperaturen aufbewahrt.

Nach Tab. 6 ist die Cholinacetylase des Gehirns offenbar kein allzu empfindliches Ferment, und es erscheint darum nicht notwendig, die Gewebe sofort nach dem Tode mit CO_2-Schnee zu behandeln, wie das De Roetth (1950) in Nachmansohns Laboratorium bei der Untersuchung der Cholinacetylase des Auges getan hat.

Wir untersuchten die 3 normalen menschlichen Gehirne Nr. 11, 12 und 13 der Tab. 1. Die Gehirne wurde 2,5—3,5 Std nach dem Tode

entnommen, und etwa eine weitere Stunde verging, bis die letzte Partie in das kalte Aceton gebracht worden war. In diesen 3 Gehirnen war der Cholinacetylasewert des Nucleus caudatus mindestens von derselben Größenordnung wie der von Wajda gefundene Wert von 170 μg/g/Std. Die Innentemperatur der Gehirne war bei der Entnahme etwa 30° C. Wir müssen also auf Grund unserer Autolyseversuche an Rattengehirnen annehmen, daß infolge von Autolyse die von uns am menschlichen Gehirn gewonnenen Werte zu niedrig sind, und daß das frische Gehirn doppelt so hohe Werte an Cholinacetylaseaktivität ergeben würde. Wenn dem so ist, würde das Gehirn des Menschen dieselbe Cholinacetylaseaktivität wie das Hundegehirn haben.

Tabelle 6. *Aktivität der Cholinacetylase im Gehirn der Ratte nach postmortaler Autolyse.*

Umgebungs-Temp. ° C	Dauer d. Autolyse Std	Acetylase Mittel μg/g/Std	$\pm \varepsilon$	Verlust in % der Norm	n	t_{Diff}	p	signifikant?
Normalwert:		660	16,87		10			
13	12	634	32,94	4	10	0,70	$> 0{,}05$	nein
13	18	634	34,58	4	10	0,68	$> 0{,}05$	nein
13	24	457	29,08	31	10	6,04	$< 0{,}0027$	ja
23	12	570	26,21	14	10	2,89	$< 0{,}01$	ja
30	3	334	9,35	49	5	16,9	$< 0{,}0027$	ja
37,5	3	185	12,91	72	5	22,36	$< 0{,}0027$	ja

Niedrigere Werte wurden bei drei anderen menschlichen Gehirnen gefunden, bei denen eine stärkere Autolyse stattgefunden haben muß. In einem Fall einer 18jährigen Frau mit Peritonitis war die Leiche noch 12 Std post mortem nicht bis auf Zimmertemperatur abgekühlt (Lagerung im Bett); erst 13 Std post mortem hatten wir alle Partien in das Aceton überführt. Alle untersuchten Hirnabschnitte bildeten noch Acetylcholin, allerdings in stark vermindertem Maße. Die üblichen quantitativen Abstufungen waren noch angedeutet; es bildeten Ala cinerea 13, Trigonum hypoglossi 19, Nucleus caudatus 25, Putamen 53 μg ACh/g/Std. In einem anderen Fall handelte es sich um das Gehirn eines 12jährigen Knaben, der an Sepsis gestorben war. Das Gehirn war bereits 5 Std nach dem Tode verarbeitet, jedoch ist anzunehmen, daß infolge der Sepsis die Autolyse bereits weiter fortgeschritten war und daher die Werte für Cholinacetylase besonders niedrig lagen. Es ergaben Globus pallidus nur noch 8, Nucleus caudatus 10 und Putamen 12 μg ACh/g/Std.

Es ist möglich, daß der autolytische Prozeß bei einzelnen Partien ein und desselben Gehirnes verschieden schnell verläuft. Bei den eben erwähnten Gehirnen hatten nämlich die Gebiete mit besonders hoher Cholinacetylaseaktivität prozentual weitaus stärker an Synthesefähigkeit verloren als Gebiete mittlerer oder geringerer Aktivität.

Aus Tab. 7 ergibt sich, daß Gebiete mit hohem SP-Gehalt eine geringere Cholinacetylaseaktivität besitzen als Gebiete mit niedrigem SP-Gehalt; SP-Konzentration und Cholinacetylaseaktivität sind einander also gewissermaßen umgekehrt proportional.

Diese Verhältnisse könnten darauf beruhen, daß SP die Cholinacetylase hemmt. Diese Möglichkeit läßt sich aber ausschließen, weil sich zeigen läßt, daß SP die Acetylcholinsynthese nicht hemmt, wie aus den folgenden Versuchen hervorgeht. Dazu haben wir 2 verschiedene Anordnungen gewählt, um die Wirkung von SP nicht nur unter optimalen Bedingungen zu untersuchen, sondern auch bei verlangsamter Synthese von Acetylcholin infolge von Mangel an ATP.

Tabelle 7. *Aktivität der Cholinacetylase verschiedener Abschnitte menschlicher Gehirne in µg/g/Std. Vergleiche damit die entsprechenden SP-Konzentrationen in der letzten Kolumne (Mittelwerte aus Tab. 4).*

Nr.	Gehirnpartie	1.	2.	3.	Mittel	SP E/g
1	Gyrus praecentralis	69	78	44	63	43
2	Gyrus postcentralis.	48	67	32	49	39
3	Gyrus cinguli anterior . . .	50	76	38	54	85
4	Putamen	258	294	238	267	64
5	Globus pallidus	51	72	100	78	112
6	Nucleus caudatus	187	234	160	194	85
7	Thalamus	55	57	92	68	12
8	Hypothalamus	78	98	67	81	102
9	Corpora mammillaria	39	62	43	48	34
10	Substantia grisea centralis .	82	38	44	54	119
11	Substantia nigra	39	54	33	42	699
12	Nucleus ruber	56	61	72	63	30
13	Colliculi rostrales.	63	78	121	87	55
14	Colliculi caudales	31	38	37	35	141
15	Corpus geniculatum laterale .	60	89	96	82	5
16	Corpus geniculatum mediale	48	64	44	52	37
17	Ala cinerea	107	190	103	133	248
18	Trigonum hypoglossi	133	205	130	156	37

Um den natürlichen Verhältnissen möglichst nahe zu bleiben, arbeiteten wir nicht mit acetongetrockneten, sondern mit frischen Gehirnen, die nach Homogenisierung auch nicht zentrifugiert wurden. Um die bisher angewandten Konzentrationen des Ferments zu erhalten (50 mg Gehirntrockenpulver auf 4,5 ml Gesamtvolumen), zerrieben wir frisches Rattengehirn je Gramm in 7,5 ml der Extraktionslösung von Korey, De Braganza u. Nachmansohn (1951); in 1,5 ml befanden sich also 0,2 g, was etwa 50 mg Trockengehirn entspricht. Um eine etwaige SP-Wirkung klar erkennen zu können, setzten wir pro Ansatz von unserem SP-Standardpulver (mit 5,5 E/mg) so viel zu, daß eine SP-Konzentration entsprechend 200 E pro Gramm Frischgewicht entstand, d. h. 40 E pro 200 mg Frischgehirn. Jeder Inkubationsansatz enthielt demnach 1,5 ml Gehirnemulsion, 1,5 ml 0,006 m Phosphatpuffer (p_H 7) oder mit diesem Puffer angesetzte SP-Lösung, 1,5 ml Inkubationsgemisch mit oder ohne ATP. Diese Gemische wurden nach einer einstündigen Inkubation bei 37° C wie üblich aufgearbeitet (vgl. Feldberg u. Vogt, 1948).

SP verstärkt die Wirkung des Acetylcholins auf den Musculus rectus abd. des Frosches. Um diesen Faktor bei der Auswertung zu berücksichtigen, wurde folgendermaßen vorgegangen: Alle Extrakte wurden erst mit einer Acetylcholin-Standardlösung wie üblich verglichen. Danach wurde festgestellt, wie stark der Standardwert durch SP-Konzentrationen verstärkt wurde, die denen entsprachen, die durch die Zugabe der Proben von SP-haltigen Extrakten in der Suspensionsflüssigkeit entstanden; dann wurde die notwendige Korrektur der Werte vorgenommen.

Die Zahlen dieser Tabelle sind die in 1 Std bei 37° C gebildeten Acetylcholinmengen in μg, bezogen auf 1 g Trockengewicht (bei Annahme eines Wassergehaltes des frischen Gewebes von 75%).

Tabelle 8.

Einfluß von Substanz P auf die Aktivität der Cholinacetylase des Gehirns. Versuche in vitro mit frischem Rattengehirn.

	—ATP	—ATP + SP	+ ATP	+ ATP + SP
	45	46	126	129
	41	45	133	108
	43	46	123	118
	21	20	112	98
	22	22	111	95
	21	23	83	86
	47	47	131	135
	51	56	137	144
	51	58	139	145
Mittel:	38	40	122	118
$\pm \varepsilon$:	4,3	4,91	5,86	7,33

Aus Tab. 8 ergibt sich, daß frisches Gehirn wesentlich weniger Acetylcholin bildet als acetongetrocknetes Hirnpulver; dies steht in Übereinstimmung mit den Resultaten von Feldberg u. Mann (1945), die die große Aktivität von Extrakten aus Acetonpulver zuerst beobachtet hatten. Unsere Ergebnisse zeigen weiter die Bedeutung von ATP für die Aktivität der Cholinacetylase. Ein Vergleich der Werte in der ersten und dritten Spalte mit denen der zweiten und vierten Spalte der Tab. 8 zeigt eindeutig, daß SP in vitro die Cholinacetylase nicht hemmt.

Diskussion.

In unseren Versuchen sind die SP-Konzentrationen, die wir beim Rind und beim Menschen im Gehirn gefunden haben, niedriger als die von Pernow (1953) für das Hundegehirn angegebenen Werte. Die hohen Werte, die Pernow erhielt, können darauf beruhen, daß ein Teil der Wirkung durch Enteramin bedingt war. Bei unserer Untersuchungsmethode ist diese Fehlerquelle ausgeschaltet.

Die SP-Konzentration zeigt für jeden Teil des Gehirns einen charakteristischen Wert, selbst eng benachbarte Partien weisen große Unterschiede auf. Diese Unterschiede gehen nicht mit der Zahl der Nervenzellen Hand in Hand, obgleich die weiße Substanz praktisch frei von SP ist. Letzteres hat auch Pernow festgestellt; eine Ausnahme bildeten bei ihm die Crura cerebri (bei uns Pes pedunculi genannt), in denen er eine auffallend hohe Konzentration von SP fand. Das könnte unserer Ansicht nach darauf beruhen, daß sein Material mit Substantia nigra verunreinigt war. Das von uns gefundene Vorkommen von SP in der „Decussatio crurum cerebello-cerebralium" vom Rind mag ebenfalls auf

eine Beimengung von Gewebe der Substantia nigra zurückzuführen sein. Da die Zahl der Nervenzellen offenbar nicht für den Gehalt an SP maßgebend ist, müssen die Unterschiede, die wir z. B. für die akustischen und optischen Zentren im Mesencephalon fanden, wohl mit bestimmten Funktionen dieser Gebiete zusammenhängen.

Bevor wir überhaupt die Frage nach der funktionellen Bedeutung von SP im Zentralnervensystem erörtern können, müssen wir wissen, ob SP die wirksame Substanz selbst ist oder nur eine Vorstufe oder ein Abfallprodukt darstellt. Zum Beispiel nimmt Umrath (1953) an, daß die im Nervensystem vorkommende SP durch ein Ferment, das sich ebenfalls im Nervengewebe findet, abgebaut und dabei in die „Erregungssubstanz sensibler Nerven" von Hellauer u. Umrath (1948a, b) umgewandelt wird. Die von uns gefundene Verteilung von SP im Gehirn ist schwer mit dieser Vorstellung sowie mit der von Lembeck (1953) vertretenen Ansicht, daß SP der Überträgerstoff sensibler Neurone sei, in Einklang zu bringen. Es ist zur Zeit noch nicht einmal möglich zu sagen, ob SP mit nervöser Aktivität etwas zu tun hat oder eine davon unabhängige Funktion für das Nervengewebe ausübt.

Die Unterschiede im SP-Gehalt der verschiedenen Abschnitte des Zentralnervensystems könnten darauf beruhen, daß diese Substanz an einen bestimmten biochemischen Prozeß gebunden ist, der allen Nervenzellen in verschiedener Intensität zukommt, oder daß sie an einen biochemischen Vorgang geknüpft ist, der nur bestimmten Nervenzellen eigen ist.

In diesem letzteren Falle könnten histologische und histochemische Untersuchungen Aufklärungen bringen, denn da SP ein Eiweißkörper ist, liegt eine abweichende histologische Färbbarkeit SP-reicher Gebiete nicht außerhalb des Möglichen. Bei entsprechender Färbetechnik sollte sich erkennen lassen, ob die SP-Konzentration selbst in den Nervenzellen von Gebiet zu Gebiet variiert, oder ob die Zahl eingestreuter „SP-Zellen" (mit konstanter SP-Konzentration) schwankt. Für die Verteilung der Cholinacetylase nehmen Feldberg u. Vogt (1948) an, daß die Unterschiede darauf beruhen, daß die Zahl cholinergischer Neurone in verschiedenen Hirngebieten schwankt.

Unsere Versuche zeigen, daß der Gehalt an SP in den verschiedenen Hirngebieten mehr variiert als der an Cholinacetylase. Dieses verschiedene Verhalten ist besonders eindrucksvoll, wenn man benachbarte Gebiete betrachtet, in denen der SP-Gehalt stark schwankt, und wenn man diese Schwankungen mit denen im Cholinacetylasegehalt derselben Gebiete vergleicht. Dies ist in Tab. 9 geschehen, in welcher die Unterschiede im SP- und im Cholinacetylasegehalt benachbarter Gebiete als Quotienten ausgedrückt sind.

Von den benachbarten Gebieten bildet dasjenige, das den höheren SP-Gehalt hat, den Zähler des Quotienten; daher sind die Quotienten für SP immer größer als 1. Für Cholinacetylase dagegen sind die Quotienten derselben Gebiete immer kleiner als 1; daraus ergibt sich, daß Gebiete mit hohem SP-Gehalt wenig Cholin-

acetylase enthalten und umgekehrt. In der Tab. 9 sind nur die Werte vom menschlichen Gehirn berücksichtigt worden, da wir am Hundegehirn nur den Gehalt an Cholinacetylase und nicht den an SP bestimmt haben. Es ist jedoch bemerkenswert, daß der Quotient für den Cholinacetylasegehalt der in der Tab. 9 verglichenen Partien auch beim Hundegehirn kleiner als 1 ist. Wir selber haben beim Hundegehirn nicht die Cholinacetylase in der Substantia nigra und im Nucleus ruber bestimmt. Dies haben dagegen Feldberg u. Vogt (1948) getan, und der Quotient ist bei ihren Werten ebenfalls kleiner als 1, nämlich 0,6.

Tabelle 9.

Das verschiedene Verhalten im Gehalt an Substanz P und an Cholinacetylase zwischen je 2 benachbarten Gebieten des menschlichen Gehirnes, ausgedrückt als Quotienten.

	Substanz P	Cholinacetylase
Ala cinerea / Trigonum hypoglossi	6,7	0,85
Colliculi caudales / Colliculi rostrales	2,7	0,4
Corpora genic. med. / Corpora genic. lat.	7,5	0,63
Substantia nigra / Nucleus ruber	23,3	0,78
Globus pallidus / Putamen	1,8	0,29
Substantia grisea centralis / Thalamus	10,0	0,8

Der Unterschied zwischen SP- und Cholinacetylasegehalt ist auch dann deutlich, wenn man den Vergleich auf das Neo- und Palaeostriatum ausdehnt. Dies ist in Tab. 10 geschehen, in der außerdem die Cholinesterasewerte von Okinaka u. Mitarb. (1951) mit aufgeführt wurden. Daraus ergibt sich einmal, daß der Unterschied im SP- und im Cholinacetylasegehalt in den phylogenetisch alten und neuen Gebieten vorhanden ist, ferner, daß die phylogenetisch neuen Gebiete einen sehr viel höheren Cholinacetylasegehalt haben als die älteren Abschnitte. Der Cholinesterasegehalt folgt hier dem der Cholinacetylase, was nicht immer der Fall ist, z. B. nicht im Kleinhirn, das eine auffallend hohe Cholinesterasekonzentration und nur Spuren von Cholinacetylase enthält.

Tabelle 10.

Substanz P, Cholinacetylase und Cholinesterase in Neo- und Palaeostriatum des menschlichen Gehirns. Cholinesterase: Werte berechnet nach den Befunden von Okinaka *u. Mitarb. (1951).*

	Substanz P E/g frisch	Acetylase γgACh/g frisch/Std	Esterase mg ACh/g frisch/Std
Neostriatum (Putamen + Nucleus caudatus) . .	74	230	273
Palaeostriatum (Globus pallidus)	112	78	45

Wajda (1951) ist der Ansicht, daß der hohe Cholinesterasegehalt im Kleinhirn nicht als Ausdruck eines intensiven Acetylcholinstoffwechsels anzusehen ist, sondern vielleicht eine Defensiveinrichtung gegen störendes Auftreten von Acetylcholin darstellt. Dagegen wissen wir, daß im Gehirn der Cholinacetylasegehalt und der Gehalt an Acetylcholin parallel gehen. Für den Acetylcholinstoffwechsel des

Zentralnervensystems ist darum der Gehalt an Cholinacetylase ein zuverlässigerer Index als der an Cholinesterase (Feldberg u. Vogt, 1948).

Kopera u. Lazarini (1953) fanden eine hohe Konzentration an SP besonders in den Gebieten des Gehirnes, in denen Feldberg u. Vogt (1948) wenig Cholinacetylase gefunden hatten; sie glauben daher, daß eine hohe Konzentration an SP typisch für Hirngebiete ist, die keine oder nur eine geringe Zahl cholinergischer Neurone enthalten. Viele unserer Befunde stimmen mit dieser Auffassung überein, wie dies Tab. 11 veranschaulicht.

Tabelle 11.

Cholinacetylase überwiegt über Substanz P: Vorwiegend cholinergisch:	Substanz P überwiegt über Cholinacetylase: Vorwiegend nichtcholinergisch:
Putamen	Gyrus cinguli anterior
Nucleus caudatus	Globus pallidus
Thalamus	Hypothalamus
Nucleus ruber	Substantia grisea centralis
Colliculi rostrales	Substantia nigra
Corpora geniculata lateralia	Colliculi caudales
Trigonum hypoglossi	Corpora geniculata medialia
	Ala cinerea

Es gibt jedoch Ausnahmen. Zum Beispiel enthält die Rinde des Kleinhirns nicht nur wenig Cholinacetylase sondern auch kaum SP. Wenn man also glaubt, aus der Verteilung von SP und Cholinacetylase Hinweise auf die Reichhaltigkeit eines Hirngebietes an cholinergischen und nichtcholinergischen Neuronen gewinnen zu können, müßte man annehmen, daß es verschiedenartige nichtcholinergische Neurone gibt, nämlich solche, für die SP notwendig ist und solche, für die SP nicht notwendig ist. Es ist jedoch noch nicht bewiesen, ob SP überhaupt mit der Überträgerfunktion der zentralen Neurone zusammenhängt; selbst für die Überträgerfunktion von Acetylcholin im Zentralnervensystem sind die Ansichten noch geteilt.

Zusammenfassung.

1. Es wird die Verteilung von Substanz P im menschlichen und im Rindergehirn und die Verteilung von Cholinacetylase im menschlichen und im Hundegehirn untersucht.

2. An 10 Rindergehirnen wurden je 11, an 10 menschlichen Gehirnen wurden je 22 verschiedene Areale auf ihren Gehalt an Substanz P untersucht. Substanz P ist über das Gehirn nicht gleichförmig, sondern mit von Gebiet zu Gebiet stark wechselnder Konzentration verteilt. Die höchste Konzentration weist die Substantia nigra auf, die nächsthöchste die Ala cinerea.

3. Die Anwesenheit von Enteramin in Hirnextrakten kann im pharmakologischen Versuch zu hohe Substanz P-Werte vortäuschen; diese Fehlerquelle wurde in den gegenwärtigen Versuchen vermieden, indem bei der Auswertung am isolierten Ileum des Meerschweinchens nach Gaddum (1953) vorgegangen wurde.

4. Da vor der Verarbeitung der menschlichen Gehirne zur Bestimmung des Cholinacetylasegehaltes postmortale Autolyse nicht ausgeschlossen

werden konnte, wurde die Wirkung der Autolyse bei verschiedenen Temperaturen auf die Aktivität der Cholinacetylase von Rattengehirnen untersucht. Autolyse führt zu einer Abnahme der Aktivität.

5. An 3 Hundegehirnen wurden je 11, an 3 menschlichen Gehirnen wurden je 18 verschiedene Areale auf ihre Cholinacetylaseaktivität untersucht. Die am Hund gewonnenen Ergebnisse zeigten untereinander dieselben quantitativen Relationen wie die menschlichen Werte.

6. Hirngebiete mit hoher Cholinacetylaseaktivität enthielten relativ wenig Substanz P und Gebiete mit hoher Konzentration an Substanz P relativ wenig Cholinacetylase.

7. Dies beruht jedoch nicht auf einer hemmenden Wirkung von Substanz P auf die Cholinacetylase, denn es wurde gezeigt, daß die Acetylcholinsynthese in Hirnextrakten durch Zusatz von Substanz P nicht beeinflußt wird.

8. Das Vorkommen von Substanz P ist besonders für Gehirnpartien charakteristisch, bei denen cholinergische Neurone in der Minderzahl sind.

Literatur.

Cammermeyer, J.: Acta anat. (Basel) **2**, 249 (1946/47). — Dalgliesh, C. E., C. C. Toh and T. S. Work: J. of Physiol. **120**, 298 (1953). — Erspamer, V.: Naturwissenschaften **40**, 318 (1953). — Rend. Scient. Farmitalia Vol. 1 (1954). — Euler, U. S., v.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **4**, 373 (1942). — Euler, U. S., v., and J. H. Gaddum: J. of Physiol. **72**, 74 (1931). — Feldberg, W.: Physiologic. Rev. **25**, 596 (1945). — Brit. Med. Bull. **6**, 320 (1950). — Arch. internat. Physiol. **59**, 544 (1951). — Feldberg, W., G. W. Harris and R. C. Y. Lin: J. of Physiol. **112**, 400 (1951). — Feldberg, W., and T. Mann: J. of Physiol. **104**, 8 (1945). — Feldberg, W., and C. C. Toh: J. of Physiol. **119**, 352 (1953). — Feldberg, W., and M. Vogt: J. of Physiol. **107**, 372 (1948). — Fulton, J. F.: Physiologie des Nervensystems. Stuttgart 1952. — Gaddum, J. H.: J. of Physiol. **119**, 363 (1953). — Gaddum, J. H., and H. Schild: J. of Physiol. **83**, 1 (1934/35). — Gullbring, B.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **6**, 246 (1943). — Hellauer, H. F., u. K. Umrath: Pflügers Arch. **249**, 619 (1948a); **250**, 737 (1948b). — Jefferson, G.: Brit. Med. Bull. **6**, 333 (1950). — Kopera, H., u. W. Lazarini: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 214 (1953). — Korey, S. R., B. De Braganza and D. Nachmansohn: J. of Biol. Chem. **189**, 705 (1951). — Lembeck, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 197 (1953). — Nachmansohn, D., and M. Berman: J. of Biol. Chem. **165**, 550 (1946). — Okinaka, S., M. Yoshikawa, K. Shizume, H. Ibayashi, A. Oyama, J. Goto and F. Nakata: Tohoku J. Exper. Med. **55**, 81 (1951). — Pernow, B.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **29**, Suppl. 105 (1953). — Roetth jr., A., De: Arch. of Ophthalm. **43**, 849 (1950). — Twarog, B. M., and J. H. Page: Amer. J. Physiol. **175**, 157 (1953). — Umrath, K.: Pflügers Arch. **258**, 230 (1953). — Vogt, M.: Brit. J. Pharmacol. **8**, 193 (1953); J. of Physiol. **123**, 451 (1954). — Wajda, I. J.: The metabolism of acetylcholine in the central nervous system. Birmingham: Thesis (Ph. D.) 1951. — Welsh, J. H., and J. E. Hyde: J. of Neurophysiol. **7**, 41 (1944). — Wislocki, G. B., and E. H. Leduc: J. Comp. Neur. **96**, 371 (1952). — Zetler, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 316 (1952). — Zetler, G., u. L. Schlosser: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 345 (1954).

Privatdozent Dr. G. Zetler, Kiel, Pharmakologisches Institut der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 176—178 (1955).

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. Erich Müller).

Eine papierchromatographische Methode zur Messung der Cholinesteraseaktivität.

Von
Wilhelm Homann.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 11. September 1954.)

Die Minderung des Acetylcholinspiegels (ACH) als Folge der Cholinesterasetätigkeit (CHE) kann auf verschiedene Weise gemessen werden. Während man früher die *direkte* Bestimmung des am Ende des Versuchs noch vorhandenen ACH durch den biologischen Nachweis nach Führer (1918) und Minz (1924) bevorzugte, ist in den letzten Jahren mehr die Methode einer *indirekten* Messung des ACH-Abbaus mit Hilfe der quantitativen Bestimmung der bei der ACH-Spaltung frei werdenden Essigsäure in den Vordergrund getreten. Die entstehende Essigsäure wird dabei mit Indicator oder auch elektrometrisch titriert, sie kann aber auch nach den Angaben von Ammon (1934) mit der Warburgschen Apparatur manometrisch bestimmt werden.

Allen angeführten Methoden haftet der große Nachteil an, daß sie nur mit einiger Erfahrung sicher zu beherrschen sind und daß sie zum Teil an nicht immer leicht zu handhabende Apparaturen gebunden sind. Für routinemäßige Untersuchungen sind sie infolgedessen wenig geeignet.

Eine wesentliche Vereinfachung des CHE-Aktivitätsnachweises bietet sich in der neuerdings entwickelten Möglichkeit an, ACH papierchromatographisch darzustellen. Voraussetzung ist allerdings eine genügende Empfindlichkeit der Methode, die es erlauben muß, die bei den üblichen Untersuchungen zur Frage der CHE-Aktivität zu erwartenden Unterschiede im ACH-Gehalt der Untersuchungsmedien genügend eindeutig darzustellen und möglichst quantitativ zu erfassen.

In Voruntersuchungen ergab eine Überprüfung der Empfindlichkeit der papierchromatographischen ACH-Darstellung nach Whittacker und Wjesundra (1951), daß sich mit dieser Methode Mengen von 3 mg ACH/cm³ noch eindeutig darstellen lassen und daß mengenmäßige Unterschiede bis zu 1 mg ACH/cm³ erfaßbar sind. Die Empfindlichkeit und Genauigkeit der Methode ist also als ausreichend anzusehen.

Grundsätzlich bleibt die Anlage eines Versuchs zur Bestimmung der CHE-Aktivität auch bei Verwendung der Papierchromatographie die gleiche, wie bei den bisher üblichen Methoden: Zu dem zu untersuchenden

Substrat wird eine bestimmte Menge ACH zugesetzt und die Minderung des ACH-Spiegels als Folge der CHE-Wirkung innerhalb einer bestimmten Zeit gemessen. Der Unterschied zu den anderen Methoden besteht nur darin, daß diese ACH-Messung, wie im biologischen Versuch, direkt erfolgt und eben papierchromatographisch.

Unter Berücksichtigung einiger kleiner Änderungen gegenüber den Standardmethoden stellt sich unser Untersuchungsgang wie folgt dar:

1 cm³ des zu prüfenden Substrats, z. B. Blutserum, gewaschene Erythrocyten, Muskelhomogenat usw. werden mit 0,5 cm³ eines Veronal-Acetatpuffers vom p_H 7,6 versetzt und dann 0,5 cm³ einer ACH-Lösung zugegeben. Im Hinblick auf eine für die Papierchromatographie günstige Konzentration wählten wir meistens eine 3- oder besser eine 1,5%ige ACH-Lösung, was ohne Berücksichtigung des ACH-Abbaus durch den Versuch einer im Chromatogramm aufgesetzten Menge von 100 bzw. 40 γ entspricht. Um für die CHE-Tätigkeit gleichbleibende und konstante Bedingungen herzustellen, verbrachten wir das Versuchsgemisch für jeweils 30 min in einen Brutschrank bei 45° C (Gomori, 1949). Anschließend wurde chromatographiert.

Um nach dem Aufenthalt des zu prüfenden Substrats im Brutschrank ein Weiterwirken der CHE mit Sicherheit zu unterbinden, empfiehlt sich ein sofortiger Zusatz von Eserin in geeigneter Konzentration.

Die Chromatographie erfolgte bei Zimmertemperatur mit einem Gemisch aus 5 Teilen normalem Propylalkohol und je 2 Teilen Benzylalkohol und Wasser als Lösungsmittel.

Die Chromatographie kann selbstverständlich im auf- oder absteigenden Chromatogramm durchgeführt werden. Nachdem sich aber herausstellte, daß keine störenden Nebensubstanzen die Darstellung des ACH beeinträchtigen, wandten wir ausschließlich die Rundfiltermethode an. Sie hat den Vorteil einer Verkürzung der Laufzeit, die auch im Rundfilterchromatogramm noch 8—10 Std beträgt. Außerdem können gleichzeitig mehrere Untersuchungen, vor allem auch Kontrollen mit in gleicher Weise verdünnten reinen ACH-Lösungen durchgeführt werden, wenn die Untersuchungslösungen auf einem kleinen konzentrischen Kreis um den Mittelpunkt der zentralen Lasche aufgesetzt werden (Cramer, 1953).

Um eine weitere Verkürzung der Laufzeit zu erreichen und gleichzeitig mehrere Untersuchungslösungen mitlaufen zu lassen, unternahmen wir Versuche mit Rundfiltern, die statt der einen zentralen Lasche 8—10 randständige, in zwei Reihen gegenüberliegende Laschen besitzen. Die so erzielten Chromatogramme entstanden unter Verkürzung der Laufzeit auf etwa 2 Std und waren von der gleichen Auswertbarkeit, wie die üblichen Rundfilterchromatogramme. Man hat sogar den Eindruck, als seien die entstehenden Farbflecke noch besser begrenzt, was als Beeinflussung des Laufs der Substanzen in Richtung auf die ideale Adsorptionsisotherme durch die dicht nebeneinanderliegenden Lauffelder gedeutet werden kann (Abb. 1).

Die Auswertung der Chromatogramme der ACH-Darstellung erfolgt in der bekannten Weise durch planimetrische Ausmessung der Farbflecke. Sie wird noch erleichtert dadurch, daß wir in jedem Chromatogramm eine reine ACH-Lösung im Verdünnungsverhältnis des Versuchs mitlaufen ließen. Umrechnungen auf die bekanntesten Faktoren für die CHE-Aktivität, den Nachmannsohnschen Faktor Q oder den Augustinssonschen Faktor Cf sind möglich. Sie basieren auf der Definition dieser Faktoren. Da der Nachmannsohnsche Faktor Q die Menge ACH in mg darstellt, die durch 100 mg Gewebe innerhalb von 60 min bei 20° C hydrolysiert wird, ist lediglich ein Kontrollversuch zur Ermittlung des Umrechnungsfaktors notwendig. Das gleiche gilt für den Augustinssonschen Faktor Cf, der die Menge ACH in γmol bedeutet, die innerhalb von 60 min durch 1 mg der zu untersuchenden Substanz in getrocknetem Zustand abgebaut wird.

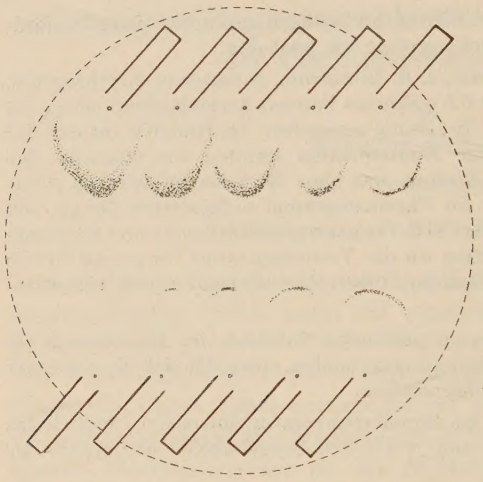


Abb. 1. Schematische Darstellung einer ACH-Verdünnungsreihe im Mehrlaschenchromatogramm.

Zusammenfassung.

1. Es wird über die Möglichkeit berichtet, die CHE-Aktivität durch eine direkte papierchromatographische Bestimmung des ACH-Abbaus zu messen.

2. Zur Verkürzung der Laufzeit des Chromatogramms wird das Rundfilter in der Form des Mehrlaschenchromatogramm empfohlen.

Literatur.

Ammon, R.: Erg. Enzymforsch. **4**, 102 (1935). — Pflügers Arch. **233**, 486 (1933). — Augustinsson, K. B.: Ark. Kemi. (Stockh.) **18** A, No. 24 (1944). — Cholinesterase, Stockholm 1948 [Acta physiol. scand. (Stockh.) Vol. 15, Suppl. 52]. — Cramer, F.: Papierchromatographie. Weinheim, Bergstraße: Verlag Chemie GmbH 1953. — Führer, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **82**, 81 (1918). — Gomori, G.: J. Labor. a. Clin. Med. **34**, 275 (1949). — Minz, B.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **168**, 292 (1932). — Nachmannsohn, D.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **130**, 1065 (1939). — Whittaker, W., u. K. Wjesundra: Biochemic. J. **51**, 348 (1951).

Dr. med. Dr. phil. W. Homann, Erlangen, Pathol. Institut.

Aufnahmebedingungen.

I. Sachliche Anforderungen.

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.
2. Der Inhalt der Arbeit darf nicht — sei es auch nur zum Teil oder in anderer sprachlicher Fassung — bereits bei ner anderen Zeitschrift zur Veröffentlichung gelangt oder eingereicht sein.
3. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Be- nde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beob- htungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vor- ufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tat- stände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die rschung anregen.

II. Formelle Anforderungen.

1. Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern nzuliefern. Diktierte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und nsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn sie neue Gedankengänge bezeichnen.
2. Die Arbeiten müssen *kurz* und sprachlich gut geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu rmeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des nemas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) rzustellen.
3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Dar- ellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.
4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenstellung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, hin- gen können besondere Inhaltsverzeichnisse für einzelne Arbeiten nicht abgedruckt werden.
5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll (Krankengeschichten, ktionsbericht, Versuch) im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial nn im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche bellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. (Es wird empfohlen, durch eine Fußnote darauf hin- weisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.)
6. Die *Abbildungen* sind auf das wirklich *unbedingt Notwendige* zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur r Illustration von Befunden dienen, die ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. sonders gilt dies von Rußkurven, die nur angebracht werden, wenn damit ganz außergewöhnliche, neue Befunde be- t werden. Kurze, aber erschöpfende Abbildungsunterschriften erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Für jede rsuchsart, jede Krankenbeschreibung, jedes Präparat ist nur ein gleichartiges Bild, Kurve u. ä. zulässig. Unzulässig die doppelte Darstellung in Tabelle und Kurve. Didaktische Gesichtspunkte bleiben bei der Entscheidung über die ufnahme einer Abbildung außer Betracht, da das Archiv nicht von Anfängern gelesen wird.

a) Für Halbtonbilder (Photos, Rußkurven) sind reproduktionsfähige, d. h. scharfe, gut durchgezeichnete Vorlagen ochglanzabzüge!) einzureichen.

b) Für Kurven und Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden sollen, sind saubere, klare, t tiefschwarzer Tusche auf weißes Zeichen- oder Transparentpapier gezeichnete Vorlagen abzuliefern, die nicht mehr ngezeichnet zu werden brauchen. Ist eine Beschriftung vorgesehen, so ist sie ebenfalls reproduktionsfähig in klarer, uberer Blockschrift einzutragen. Ist der Autor dazu nicht in der Lage, wird um Angabe des Beschriftungstextes in eistift gebeten. Bei der Beschriftung durch den Autor ist zu beachten, daß die Höhe der Großbuchstaben und Zahlen der reproduzierten Abbildung 2 mm betragen soll. Ist also eine lineare Verkleinerung der Strichzeichnung auf ½ vor- sehen, so müßten die Buchstaben 4 mm groß gezeichnet werden.

7. Literaturangaben, die nur im Text berücksichtigte Arbeiten enthalten dürfen, erfolgen mit vollständigem Titel r Arbeit, Zeitschriftentitel in der Abkürzung nach den Periodica medica, Band-, Seiten- und Jahreszahl (Wochen- nriften nur Jahres- und Seitenzahl). Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alpha- tisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der be- ffenden Stelle im Text eine in Klammer gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literatur- rzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem tel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.
8. Die Beschreibung von Methodik, Protokollen und anderen weniger wichtigen Teilen ist für *Kleindruck* vorzu- rken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.
9. Das Zerlegen einer Arbeit in mehrere Mitteilungen, um den Anschein größerer Kürze zu erwecken, ist unzulässig.
10. Bei Anführungen von Handelspräparaten soll stets neben der Markenbezeichnung die chemische Zusammensetzung gegeben werden.
11. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- d Untertitel nicht die gleichen sind.
12. Festschriften, Habilitationsschriften und Monographien gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

Soeben erschien:

Pathologisch-histologisches Praktikum. Von Professor Dr. **H. Hamperl,** Direktor des Pathologischen Institutes der Universität Bonn. Vierte Auflage. Mit 185 Abbildungen, davon 9 farbige auf 2 Tafeln. VIII, 260 Seiten 8°. 1954. DM 12.60

Inhaltsübersicht: Einleitung: Blut. Herz. Gefäße. Leber. Niere. Respirationstrakt, Lunge. Milz. Zentralnervensystem. Magen-Darm-Trakt. Knochensystem. Drüsen. Geschlechtsorgane. Lymphatischer Apparat. Skeletmuskulatur. Spezifische Entzündungen. Tierische Parasiten. Gutartige Tumoren des Binde- und Stützgewebes. Bösartige Tumoren des Binde- und Stützgewebes. Gutartige epitheliale Tumoren. Bösartige epitheliale Tumoren (Krebse, Carcinome). Verschiedene Tumoren. Anhang: Zusammenstellung einiger Präparate nach Gesichtspunkten der allgemeinen Pathologie. Sachverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Handbuch der allgemeinen Pathologie

Herausgegeben von

Professor Dr. **F. Büchner**
Freiburg i. Br.

Professor Dr. **E. Letterer**
Tübingen

und Professor Dr. **F. Roulet**
Basel

Im Januar 1955 wird erscheinen:

Sechster Band:

Entwicklung, Wachstum, Geschwülste

In 3 Teilen

1. Teil:

Entwicklung, Wachstum I.

Mit 233 Abbildungen. Etwa 560 Seiten Gr.-8°. 1955.

Vorbestellpreis gültig bis zum Erscheinen. Ganzleinen DM 98.—

Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen. Ganzleinen DM 122.50

Bei Verpflichtung zur Abnahme des gesamten Handbuches gilt der Vorbestellpreis au[ch] nach Erscheinen des Bandes weiter als Subskriptionspreis, jedoch ist jeder Band u[nd] Bandteil zum Ladenpreis einzeln käuflich.

Inhaltsübersicht: **Die embryonale Entwicklung. Entwicklungsphysiologie un[d] experimentelle Teratologie.** Von Professor Dr. F. E. Lehmann-Bern. — **Allgemei[ne] Teratologie mit besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse beim Menschen.** Vo[n] Professor Dr. A. Werthemann-Basel. — **Biologie des Wachstums.** Von Professo[r] Dr. J. W. Harms-Marburg/Lahn. — **Quantitative Biologie und Morphologie de[s] Wachstums einschließlich Hypertrophie und Riesenzellen.** Von Professor Dr. A. J[.] Linzbach-Marburg/Lahn. — **Biochemie des Wachstums und der Differenzierung.** Von Professor Dr. F. Duspiva-Heidelberg. — **Regenerationen bei Pflanzen.** Von Professo[r] Dr. E. Bünning-Tübingen. — **Die Regeneration in der Zoologie.** Von Professor Dr. M[.] Lüscher-Bern. — **Die physiologische Regeneration.** Von Professor Dr. W. Masshoff [in] Tübingen. — **Namen- und Sachverzeichnis.** — Jeder Beitrag enthält ein Literatur[-] verzeichnis.

Während die verschiedenen Gebiete der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie in dem großen, von Lubarsch und Henke herausgegebenen, von Rössle fortgeführten Handbuch eine umfassende Darstellung erfahren haben, fehlt seit dem Handbuch von Krehl-Marchand in Deutschland eine solche Zusammenfassung für das Gebiet der allgemeinen Pathologie.

Herausgeber und Verlag haben es daher unternommen, ein Handbuch zu schaffen, in dem die Probleme der allgemeinen Pathologie in modernem Sinne — als allgemeine Pathobiologie sowie als morphologisch orientierte pathologische Physiologie — im Rahmen einer umfassenden Disposition zusammenhängend dargestellt werden sollen.

Der Stoff ist auf zwölf thematisch in sich abgeschlossene Bände aufgeteilt, die erforderlichenfalls in zwei bis drei Teilbände gegliedert werden.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Diesem Heft liegen zwei Prospekte des Springer-Verlages, Berlin · Göttingen · Heidelberg, bei.

Verantwortlich für den Anzeigenteil: Günter Holtz, Berlin W 35, Reichpietschufer 20. — Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH — Printed in Germany.